

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Microbiología



**TROPISMO DEL VIH-1: METODOLOGÍAS
DIAGNÓSTICAS Y APLICACIONES CLÍNICAS.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Verónica Briz Sebastián

Bajo la dirección de los doctores

Vicente Soriano Vázquez
Eva Poveda López

Madrid, 2009

- **ISBN: 978-84-692-6745-5**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología

**TROPISMO DEL VIH-1:
METODOLOGÍAS DIAGNÓSTICAS Y
APLICACIONES CLÍNICAS**

TESIS DOCTORAL

Verónica Briz Sebastián

Madrid, 2008

Tesis Doctoral

TROPISMO DEL VIH-1: METODOLOGÍAS DIAGNÓSTICAS Y APLICACIONES CLÍNICAS

Esta memoria ha sido presentada para optar al grado de Doctora en Microbiología Médica por la Universidad Complutense de Madrid por la licenciada:

Verónica Briz Sebastián

Directores de la Tesis:

Dr. Vicente Soriano Vázquez

Doctor en Medicina. Jefe de Sección. Servicio de Enfermedades Infecciosas.
Hospital Carlos III, Madrid.

Dra. Eva Poveda López

Doctora en Microbiología Médica. Responsable del Área de envoltura viral del Laboratorio de Biología Molecular. Servicio de Enfermedades Infecciosas.
Hospital Carlos III, Madrid.

V^aB^a de los Directores de la Tesis:

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas a las que quiero agradecer el apoyo y la ayuda que me han prestado durante estos tres años de tesis.

A los Drs. Juan González-Lahoz y Vicente Soriano por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis y haber confiado en mí para este proyecto.

A mi directora de tesis la Dra. Eva Poveda, por haberme guiado y ayudado durante estos tres años.

Al Dr. José Miguel Benito, por las numerosas horas empleadas en ayudarme, tanto profesional como personalmente, sin tener obligación alguna, incluso en ocasiones anteponiéndome a sus propios doctorandos.

A la Dra. Mariola López, por enseñarme, compartir sus conocimientos y por las largas discusiones profesionales mantenidas, así como por su incondicional apoyo.

A la Dra. África Holguín, por su apoyo constante en los buenos y malos momentos, así como por sus sabios consejos. Por tener siempre una palabra amable y una cálida sonrisa.

A Mar González, mi mano derecha en muchas ocasiones en el laboratorio, por su inestimable y constante ayuda tanto a nivel profesional como personal, así como por la amabilidad y dulzura mostrada.

A Marisa, por su incondicional sonrisa y apoyo, tanto profesional como personal, en los buenos y malos momentos, porque como una buena amiga me dijo una vez, para ir de copas todos servimos.

A Pilar, por su gran paciencia, por los buenos consejos, por saber transmitirme tranquilidad por ser tan buena amiga.

A Mar Molinero, por la energía y fuerza que desprende así como por su constante apoyo y amistad.

A Marcelle, por el apoyo que me ha ofrecido en todo momento y por su incondicional amistad.

A Norma, por estar siempre cuando la he necesitado compartiendo mis alegrías y tristezas. Gracias por escucharme, apoyarme, aconsejarme y estar siempre ahí.

A Eva Ramírez, por su constante apoyo, a Carolina y María, por su incondicional ayuda y su sonrisa amable, a Judith, Gonzalo, Miguel, Julio, por su paciencia, a Laura, por sus buenos consejos, a Alejandra por su apoyo, a Clara por su dulzura, y a Belén, Jose y Julie, por su amabilidad y disposición.

A Vicky y Ainhoa, por ofrecerme una sonrisa siempre que lo he necesitado, por escucharme y por su amabilidad, a Gema, por confiar en mi capacidad para escribir este tríptico, a Alma por su ayuda, siempre que la he solicitado y a Angélica por su inmensa disposición en todo momento, facilitándome el trabajo.

A Ester, mi compi de tesis, por su paciencia, disposición, gran sonrisa y amabilidad.

A Carmen, Berta, Carlos, Sonia, Antonio (farmacia), Antonio (hepatitis), Sara, Goyi, Conchi y Eduardo, por ayudarme siempre que lo he pedido.

También quisiera agradecer los médicos, Lola, Eugenia, Pilar, Yvana, José, Pablo Rivas, Pablo Barreiro, Nuria, Andrés, Luz y Pablo Labarga por sus consejos y ayuda.

A Rocío, por su paciencia y por la inestimable ayuda prestada con ese quebradero de cabeza llamado estadística, a Ana y Josefina, por la paciencia y amabilidad con la que me han tratado, así como por la rapidez mostrada en conseguir los papers que he solicitado, facilitándome el trabajo.

A Pablo y Eduardo, del servicio de informática, por solucionarme los problemas informáticos.

A Eugenia y Gema, del departamento de contabilidad, por facilitarme el papeleo que supuso la concesión de la beca FIS; a Ana y Clara del departamento de compras, por su amabilidad y ayuda con el pedido de material, y al equipo del almacén por su paciencia y ayuda cada vez que la solicitaba.

A la Dra. M^a Ángeles Muñoz por creer en mí y por facilitarme la posibilidad de incorporarme en mi actual grupo de trabajo.

A Jorge, por transmitirme calma y sensatez, por su apoyo incondicional constante y por estar ahí en los buenos y malos momentos.

Y en especial quisiera dar las gracias al gran puntal de mi vida: mi familia. A mis padres, por quererme y apoyarme, y a mis hermanas Holanda y Marta, por confiar en mí, apoyarme y ayudarme en todo momento. Muchas gracias por facilitarme la vida.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Estructura del VIH-1	2
1.2. Ciclo replicativo del VIH-1	5
1.3. Entrada del VIH-1 en la célula	6
A. Unión de la glicoproteína de superficie gp120 al receptor celular CD4	8
B. Interacción del complejo CD4-gp120 con los receptores de quimiocinas	9
C. Fusión de las membranas viral y celular	11
1.4. Tropismo viral: definición y bases moleculares	13
1.5. Dinámica del tropismo viral durante la progresión de la enfermedad	15
1.6. Impacto de la terapia antirretroviral en el tropismo viral y en la expresión del correceptor CCR5 a nivel celular	20
1.7. Implicaciones del tropismo viral en la era de los antagonistas de CCR5 y CXCR4	22
1.8. Herramientas para determinar el tropismo viral en la práctica clínica	24
2. OBJETIVOS	30
3. PACIENTES Y MÉTODOS	33
3.1. Pacientes	34
3.2. Obtención de plasma	35
3.3. Viremia plasmática	35
3.4. Recuento de linfocitos T CD4+	35
3.5. Extracción del ARN viral	36
3.6. Análisis genético del gen <i>pol</i> y de la región gp41 del gen <i>env</i>	36
3.7. Análisis genético de la región V3 de la envuelta viral	37
3.8. Purificación del amplicón	38
3.9. Secuenciación del ADN	38
3.10. Determinación genotípica del uso del correceptor	39
3.11. Determinación fenotípica del uso del correceptor	43

3.12. Obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)	43
3.13. Extracción del ADN.....	44
3.14. Determinación genotípica del receptor CCR5 (<i>CCR5</i> Δ32)	45
3.15. Determinación del nivel de interleuquina 7 (IL-7) en plasma	45
3.16. Cuantificación de la expresión del correceptor CCR5 en distintas subpoblaciones de linfocitos T	46
3.17. Análisis del nivel de activación en linfocitos T.....	47
3.18. Datos epidemiológicos y marcadores biológicos	49
3.19. Análisis estadístico	49
4. RESULTADOS.....	52
Estudio 1: Evaluación de herramientas genotípicas para la determinación del uso del correceptor en muestras clínicas tomando como referencia un ensayo fenotípico basado en virus recombinantes	53
4.1. Población de estudio	53
4.2. Concordancia entre métodos genotípicos y fenotípicos para la determinación del uso del correceptor.....	55
Estudio 2: Prevalencia de variantes VIH-1 según el uso del correceptor en diferentes etapas de la infección por VIH.....	57
4.3. Población de estudio	57
4.4. Prevalencia de variantes R5 y X4	57
4.5. Asociación entre tropismo viral y características epidemiológicas	59
4.6. Asociación entre tropismo viral y parámetros clínicos	61
4.7. Asociación entre tropismo viral y presencia de mutaciones de resistencia a las distintas familias de antirretrovirales	62
4.8. Asociación entre tropismo viral y nivel de interleuquina IL-7 en plasma.....	66

Estudio 3: Impacto del tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) en el uso del correceptor en pacientes VIH+	67
4.9. Diseño del estudio	67
4.10. Población de estudio	69
4.11. Prevalencia de cepas X4-trópicas en el momento basal	71
4.12. Factores asociados con el tropismo viral en el momento basal	71
4.13. Características del cambio en el uso del correceptor durante el seguimiento longitudinal	74
4.14. Factores asociados con el cambio del uso del correceptor durante el seguimiento longitudinal	75
Estudio 4: Influencia del tratamiento antirretroviral de gran actividad en la expresión del correceptor CCR5	77
4.15. Población de estudio	77
4.16. Perfil de expresión de la molécula CCR5 en linfocitos T CD4+ y CD8+	77
4.17. Influencia de la infección por VIH-1 en la expresión de CCR5	80
4.18. Influencia de la terapia antirretroviral en la expresión de CCR5	82
4.19. Nivel de activación en linfocitos T CD4+ y T CD8+ y evolución bajo TARGA	84
5. DISCUSIÓN	86
6. CONCLUSIONES	108
7. BIBLIOGRAFÍA	111
8. ANEXOS	135
9. ABREVIATURAS	144

INTRODUCCIÓN

1.1. ESTRUCTURA DEL VIH-1

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), es el agente infeccioso causante del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Es un virus ARN clasificado dentro de la familia de los retrovirus humanos (*Retroviridae*) que pertenece al género *Lentivirus* (Barré-Sinoussi *et al.* 1983, Gallo RC *et al.* 1983).

La estructura y organización genómica del VIH-1 se muestran en la figura 1. El VIH-1 está formado por una membrana lipídica en la que se insertan las glicoproteínas gp120 (SU) y gp41 (TM), codificadas por el gen de la envuelta (*env*). Tras la membrana viral interna se encuentra la proteína de matriz, p17, (MA), seguida de la cápside viral (CA), constituida por la proteína p24. El material genético, formado por dos copias de ARN con polaridad positiva, se localiza dentro de la cápside viral y se encuentra estabilizado a través de complejos con la proteína de la nucleocápside, p7, (NU). Las enzimas esenciales para la replicación viral, transcriptasa inversa (TI), proteasa (PR) e integrasa (IN), además de las proteínas reguladoras (Tat, Rev, Nef, Vif, Vpr, Vpu) se encuentran situadas en el interior de la cápside (Emerman *et al.* 1998, Varmus 1998, Seelamgari *et al.* 2004).

El genoma del VIH-1 posee una longitud de aproximadamente 9,8 kb. Está formado por tres genes esenciales: *gag* y *env*, que codifican las proteínas

estructurales y *pol* que codifica las enzimas virales esenciales para el ciclo replicativo viral, y 6 genes que codifican las proteínas reguladoras (Tat, Rev, Nef, Vif, Vpr, Vpu). Las secuencias repetidas largas (LTR), no codificantes, flanquean los extremos 3' y 5' del genoma viral, donde se encuentran regiones reguladoras esenciales para el ciclo replicativo del virus.

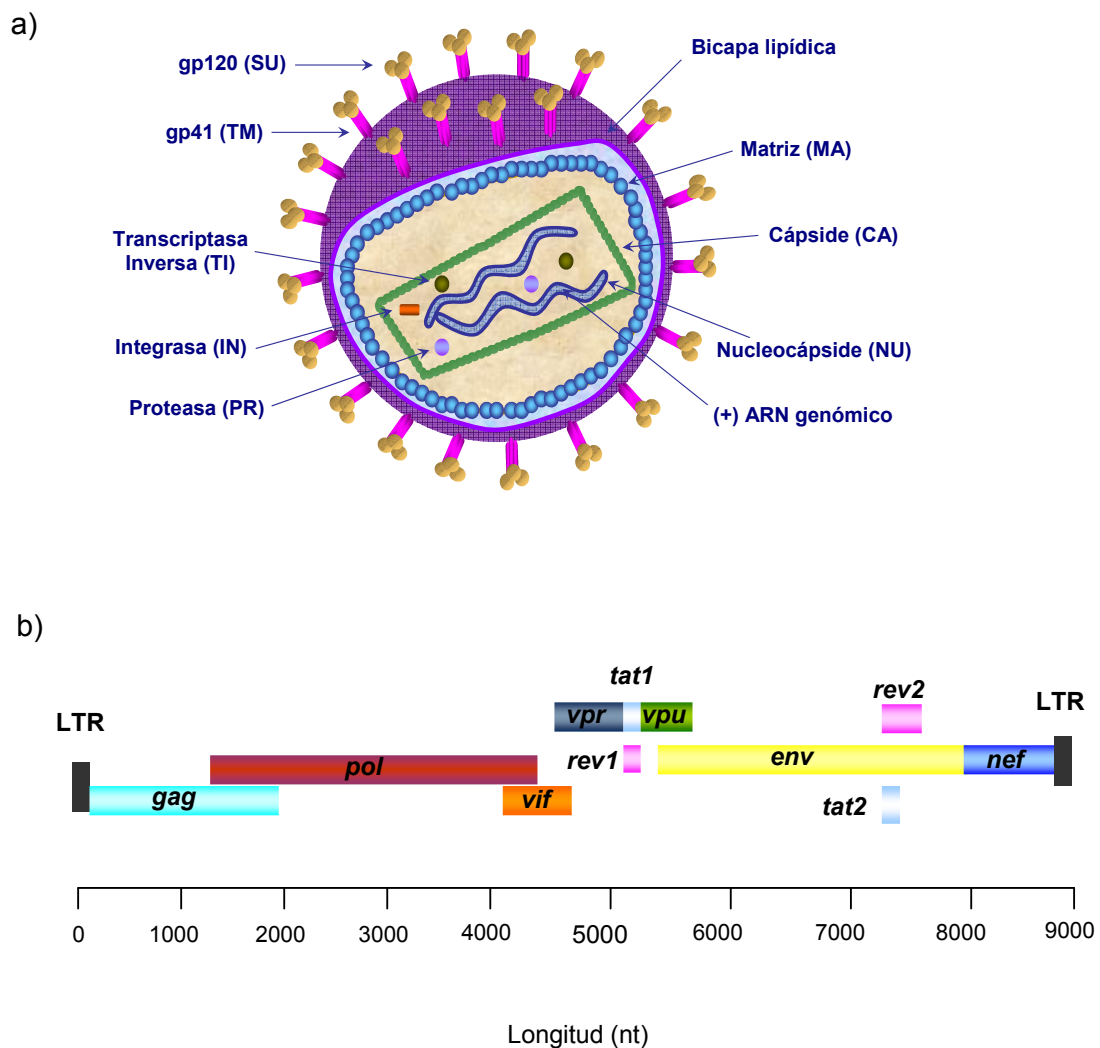


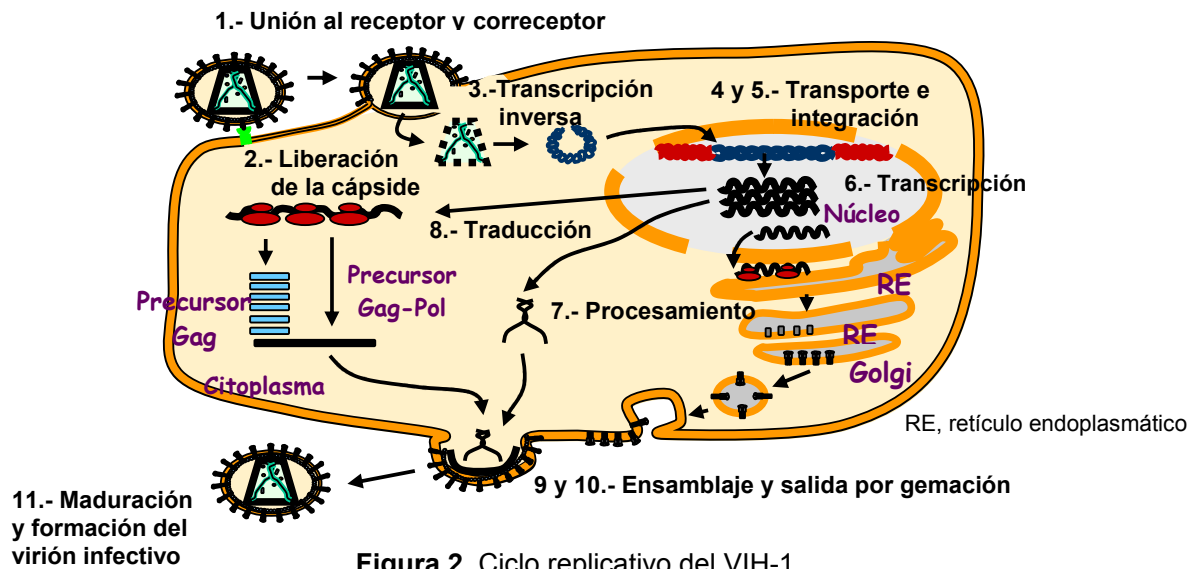
Figura 1. Estructura y genoma de los retrovirus. a) Esquema de la estructura del virión del VIH; b) esquema de su organización genómica.

En la tabla 1 se muestran los diferentes genes que van a codificar para las distintas proteínas del virus, así como su localización y función.

Gen	Proteínas	Función
<i>env</i>	gp120 (SU)	Proteína de superficie de la envuelta. Interacciona con la molécula CD4+.
	gp41 (TM)	Proteína transmembrana de la envuelta. Implicada en el anclaje de gp120 y en la fusión de la membrana viral y celular.
<i>gag</i>	p24 (CA)	Proteína estructural que forma la cápside.
	p17 (MA)	Proteína estructural que forma la matriz.
	p7 (NU)	Nucleoproteína asociada a 2 moléculas de ARN genómico, en el interior de la cápside.
	p6	Implicada en la liberación del virión.
<i>pol</i>	PR	Proteasa. Interviene en el procesamiento postransduccional de las poliproteínas gag y gag-pol.
	TI	Transcriptasa inversa. Encargada de transformar el ARN genómico en ADN complementario.
	IN	Integrasa. Encargada de integrar el ADN viral en el ADN de la célula huésped.
<i>tat</i>	Tat	Factor de transactivación transcripcional. Proteína reguladora esencial para la replicación del virus. Se une a la secuencia TAR, sitio de unión del primer iniciador de la reacción de la transcriptasa inversa, del genoma. Crítica para el inicio y elongación de la transcripción.
<i>rev</i>	Rev	Segunda proteína reguladora esencial para el virus. Regulador del transporte y procesamiento de los ARNm. Se une al elemento de respuesta a Rev (RRE).
<i>nef</i>	Nef	Regulador negativo de la presencia del receptor CD4 en la membrana celular. Disminuye la expresión de los genes del complejo principal de histocompatibilidad de tipo I.
<i>vif</i>	Vif	Proteína implicada en el transporte de complejos de preintegración, transactivación de genes celulares y parada del ciclo celular.
<i>vpr</i>	Vpr	Proteína única al VIH-1 Implicada en la degradación de CD4 en el retículo endoplasmático y liberación de viriones.

1.2. CICLO REPLICATIVO DEL VIH-1

La replicación del VIH-1 se puede dividir en las siguientes etapas: 1) entrada del virus en la célula huésped tras la unión de la glicoproteína de la envuelta gp120 del VIH al receptor celular CD4 y a un receptor de quimiocinas, CCR5 o CXCR4); 2) liberación al citoplasma de la cápside viral; 3) transcripción reversa del ARN genómico viral y formación del ADN complementario de doble cadena mediado por la transcriptasa inversa; 4) transporte del ADN al núcleo celular; 5) integración en el genoma de la célula hospedadora mediante las secuencias LTR, por la acción de la integrasa; 6) transcripción de los genes provirales; 7) procesamiento de los transcritos primarios hasta ARN genómico viral y ARNm viral; 8) traducción de los ARNm a las distintas proteínas virales en el citoplasma; 9) ensamblaje de las proteínas virales, 10) salida del virión de la célula por gemación, y 11) maduración del virión fuera de la célula huésped, por medio de la acción de la proteasa viral que corta las poliproteínas precursoras en proteínas maduras formando el virión infectivo (Levy 1993) (figura 2).



1.3. ENTRADA DEL VIH-1 EN LA CÉLULA

El VIH-1 es un virus con envuelta, siendo la proteína de la envuelta, la que media la entrada del virus en la célula diana. La glicoproteína de la envuelta es una proteína integral de membrana, que se genera como un poliproteína precursora de 160 kDa, denominada gp160. En el aparato de Golgi, mediante la acción de una proteasa celular, se genera la envuelta madura, formada por la unión no covalente de dos subunidades asociadas: la glicoproteína de superficie gp120 y la proteína transmembrana gp41 (Hallenberg *et al.* 1992). La glicoproteína de la envuelta se encuentra anclada en una bicapa lipídica formando trímeros.

La proteína viral gp120 está formada por dos dominios, uno interno y otro externo, unidos por un puente de láminas β . En dichos dominios se localizan cinco regiones conservadas (C1 a C5) y cinco regiones variables (V1 a V5). Las regiones V1/V2, V3 y C4 son las más críticas en el proceso de entrada viral. Los puentes disulfuro (Hoxie 1991, Leonard *et al.* 1990) formados entre ambos dominios darán lugar a la estructura tridimensional funcional de gp120. Uno de estos dominios, será el encargado del reconocimiento del receptor CD4 y de su unión.

El proceso de entrada consta fundamentalmente de tres etapas (figura 3):

- A. Unión de la glicoproteína de superficie gp120 al receptor celular CD4.
- B. Interacción del complejo CD4-gp120 con los receptores de quimiocinas, principalmente, CCR5 y/o CXCR4.
- C. Fusión de las membranas viral y celular.

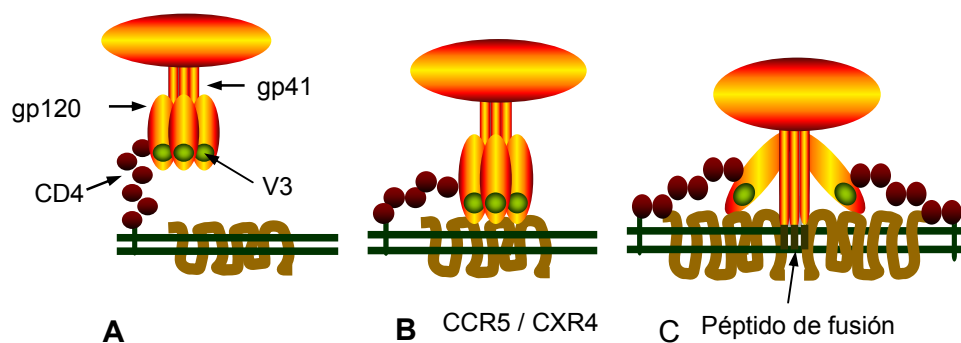


Figura 3. Entrada del VIH-1 en la célula. (A) Unión CD4-gp120, (B) interacción gp120-correceptor, (C) fusión de membranas viral y celular.

A. Unión de la glicoproteína de superficie gp120 al receptor celular CD4

En 1984 se identificó la molécula CD4 como el principal receptor del VIH-1 en las células (Dalglish *et al.* 1984, Klatzmann *et al.* 1984, Sattentau *et al.* 1988), siendo la interacción de gp120 con el receptor CD4 el primer paso del proceso de entrada viral. El antígeno CD4 es una inmunoglobulina de unos 55 KDa, localizada principalmente en la membrana plasmática de los linfocitos T (Reinherz *et al.* 1979, Maddon *et al.* 1985), y en menor medida en otros tipos celulares como macrófagos, monocitos, células de la microglía y células dendríticas, que incluyen a las células de Langerhans y a las células de la mucosa rectal, vaginal e intestinal (Reinherz *et al.* 1979, Hussain *et al.* 1995, Jordan *et al.* 1991). Su función es la de iniciar la activación de las células T CD4+.

El sitio de interacción entre CD4 y gp120 no está accesible a la superficie y está bien conservado estructuralmente. Estas características han llevado a considerar dicha unión como una posible diana terapéutica, buscando agentes que puedan unirse específicamente y bloquear esta etapa inicial de la infección viral (tabla 2). Como consecuencia de la unión CD4-gp120, el núcleo conservado de gp120 sufre cambios conformacionales, pasando de un estado flexible a otro rígido, permitiendo la posterior interacción con los receptores de quimiocinas (Myszka *et al.* 2000).

B. Interacción del complejo CD4-gp120 con los receptores de quimiocinas

Hasta mediados de los años noventa se pensó que la entrada del VIH-1 en las células requería únicamente la unión del virus al receptor celular CD4. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que miembros de la familia de los receptores de quimiocinas, son igualmente necesarios para el proceso de entrada del VIH-1 en las células. En 1996 se identificó el primer correceptor asociado al proceso de entrada del VIH-1: el receptor de quimiocinas CXCR4, denominado inicialmente fusina e involucrado en el proceso de inflamación y hematopoiesis. CXCR4 interviene en el proceso de fusión entre la célula T y las variantes virales T-trópicas, pero no se utiliza como correceptor por las cepas M-trópicas en la infección de macrófagos (Feng *et al.* 1996). SDF-1 ("*Stromal Cell Derived Factor-1*") es el ligando natural de CXCR4 (Bleul *et al.* 1996).

La identificación de las quimiocinas RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β , ligandos naturales de CCR5, como factores supresores del VIH-1 (Cocchi *et al.* 1995), así como la gran afinidad de MIP1- β por el receptor CCR5, hizo pensar que CCR5 era el correceptor principal, que junto a la molécula CD4, facilitaba la entrada de las cepas M-trópicas al interior de la células. (Alkhatib *et al.* 1996, Deng *et al.* 1996).

Aunque *in vitro* se ha demostrado que existen variantes del VIH-1 que pueden usar otros correceptores celulares para entrar en las células (Zhang *et al.* 1998,

Björndal *et al.* 1997), no se han encontrado evidencias del uso de correceptores alternativos a CCR5 y CXCR4 *in vivo*.

Los correceptores CCR5 y CXCR4 pertenecen a la familia de receptores de siete dominios transmembrana acoplados a la proteína G ("*G protein-coupled receptors*"). Presentan una estructura α -hélice de cuatro dominios transmembrana: 3 bucles extracelulares y un dominio N-terminal (Nt). La unión del complejo CD4-gp120 a los correceptores se produce a través de la región V3 de gp120, aunque existen otras regiones de gp120 que también participan en esta interacción. En particular, el brazo de la región V3 de gp120, junto con residuos del dominio conservado C4, son los responsables de la unión de gp120 al dominio Nt de CCR5, mientras que tanto la corona como el brazo de V3 son requeridos para la unión de gp120 a la superficie de CCR5 (Comier *et al.* 2002). En el caso de CXCR4, es la región V3 de gp120 la que interacciona directamente con CXCR4, con independencia de las regiones V1/V2 de gp120 (Sakaida *et al.* 1998). La consideración de los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4 como posibles dianas terapéuticas en el tratamiento de la infección por VIH-1, ha promovido el desarrollo de dos nuevas familia de fármacos, los antagonistas de CCR5 y de CXCR4 (tabla 2), que actúan inhibiendo la unión de la gp120 con estos correceptores (figura 4).

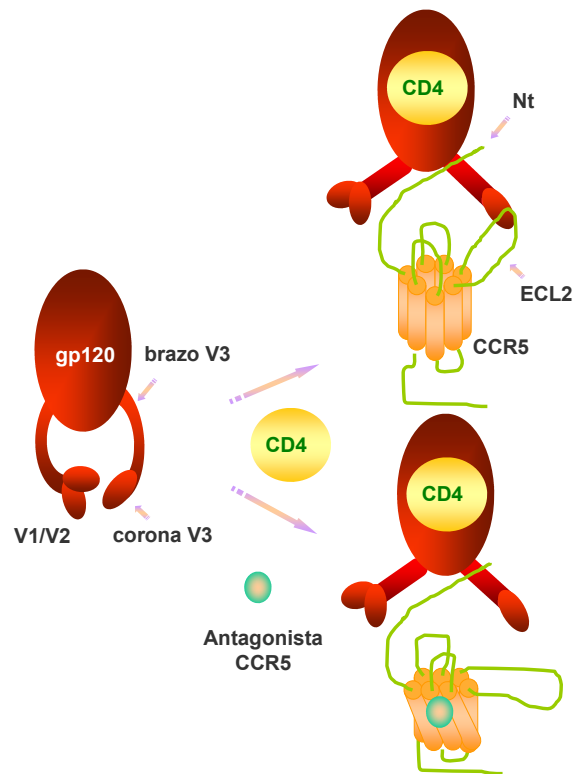


Figura 4. Modelo del mecanismo de unión del VIH-1 al receptor CCR5 en ausencia y presencia de un antagonista del correceptor

C. Fusión de las membranas viral y celular

La glicoproteína gp41 es la principal responsable del proceso de fusión de las membranas del VIH-1 y de la célula diana. Si se analiza de forma lineal la estructura de gp41, en el extremo Nt se encuentra el dominio correspondiente al péptido de fusión. Su carácter hidrofóbico permite su inserción en la membrana celular. A continuación se encuentran las regiones repetidas HR1 ("heptad-repeat 1") y HR2 ("heptad-repeat 2"), que presentan aminoácidos con

un patrón de repetición característico de 7 residuos (abcdefg), de los cuales los correspondientes a las posiciones “a” y “d” son aminoácidos hidrofóbicos. Son ellos los que median la unión de los monómeros de gp41 en la forma trimérica de la envuelta viral.

Durante el proceso de fusión se produce una reorganización estructural de gp41 que provoca la interacción entre las regiones HR1 y HR2 y lleva a la formación de una estructura termoestable de 6 hélices (“*six helix bundle*”), que es fundamental para que se produzca la fusión entre las membranas del VIH-1 y la célula diana (Lu *et al.* 1995). La estructura de 6 hélices está compuesta por un trímero interno, formado por las estructuras en espiral enrolladas de HR1, y otro trímero externo formado por las regiones HR2. Las regiones HR2 se unen de forma antiparalela a las estructuras en espiral enrollada de HR1 a través de cavidades hidrofóbicas (Weiss 2003, Cammack 2001). Las interacciones hidrofóbicas entre las regiones HR1 y HR2 confieren a la estructura de 6 hélices una gran estabilidad. El cambio en energía libre asociado a la formación de la estructura de 6 hélices es la que suministra la fuerza necesaria para producir la formación de un poro de fusión y, en consecuencia, la entrada de la cápside viral al interior celular (Mellikan *et al.* 2000). Enfuvirtida fue el primer inhibidor de la fusión aprobado para el tratamiento de la infección por VIH-1. Actualmente, una segunda generación de inhibidores de la fusión está en desarrollo.

Fármacos	Mecanismo de acción
Inhibidores CD4-gp120 TNX-355	Anticuerpo monoclonal frente a CD4
Antagonistas de CCR5 Maraviroc* Vicriviroc PRO-140 INCB9471 SHC 532706	Unión al dominio transmembrana de CCR5 Unión al dominio transmembrana de CCR5 Anticuerpo monoclonal frente a CCR5 Unión al dominio transmembrana de CCR5 Unión al dominio transmembrana de CCR5
Inhibidores de la fusión Enfuvirtida* TRI1144 [†]	Péptido sintético que mimetiza HR2 y bloquea la fusión de las membranas viral y celular

* Fármacos aprobados para uso clínico

[†] Fármacos en desarrollo preclínico

Tabla 2. Inhibidores de la entrada viral aprobados para uso clínico o en desarrollo clínico en la actualidad.

1.4. TROPISMO VIRAL: DEFINICIÓN Y BASES MOLECULARES

La definición de tropismo ha evolucionado desde que a finales de los años 80 se identificasen dos variantes fenotípicas del VIH-1. En un primer momento, el tropismo hacía referencia al efecto citopático del VIH-1 en células mononucleares de sangre periférica (CMSP). De esta manera, aquellos virus capaces de formar sincitios (células multinucleadas gigantes) se denominaron aislados inductores de sincitios (IS), mientras que el resto fueron denominados no inductores de sincitios (NIS) (Asjö *et al.* 1986, Tersmette *et al.* 1988). Una segunda clasificación de las variantes del VIH-1 fue establecida basándose en diferencias en la cinética de replicación observadas en CMSP, denominándola

“alta/rápida” o “baja/lenta” (Asjö *et al.* 1986, Evans *et al.* 1987, Cheng-Mayer *et al.* 1988, Tersmette *et al.* 1988, Fenyö *et al.* 1988). Más recientemente, se propuso una nueva clasificación basada en la habilidad del virus de replicar en dos líneas celulares: monocito-macrófagos y células T CD4+, diferenciando las variantes M-trópicas de las variantes T-trópicas (Schuitemaker *et al.* 1991, Schuitemaker *et al.* 1992, Collman *et al.* 1989).

En 1996, la identificación de los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4, que junto con el receptor celular CD4 eran requeridos por el VIH-1 para entrar en la célula, clarificó las bases moleculares del tropismo en función del receptor de quimiocinas usado para infectar la célula. El tropismo del VIH-1 por los receptores de quimiocinas fue rápidamente relacionado con algunas de sus características fenotípicas previamente establecidas. Se observó que las cepas clasificadas como NSI y M-trópicas utilizaban preferentemente el receptor CCR5 para entrar en la célula, mientras que aquellas que utilizaban CXCR4 eran generalmente cepas SI y T-trópicas (Berger 1997, Moore *et al.* 1997, Doms *et al.* 1997). Estos hallazgos permitieron una nueva clasificación de los aislados del VIH-1 basándose en el uso del correceptor, estableciendo tres categorías: cepas CCR5-trópicas (R5), CXCR4-trópicas (X4), y duales/mixtas (R5/X4) (Berger *et al.* 1998) (figura 5).

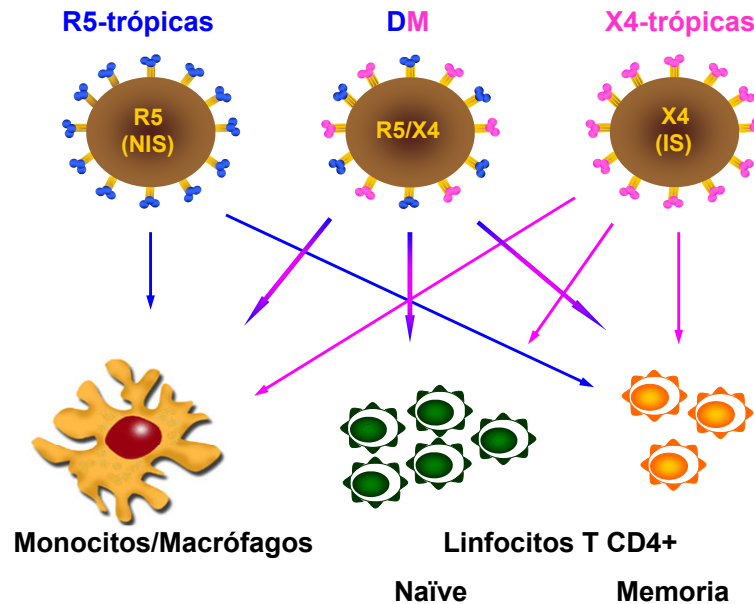


Figura 5. Clasificación de las variantes del VIH-1 en función del uso del correceptor

1.5. DINÁMICA DEL TROPISMO VIRAL DURANTE LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD

En los últimos años se ha relacionado el tropismo viral por los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4, con la evolución de la infección y con la progresión de la enfermedad. Las variantes R5-trópicas, parecen ser las responsables de la transmisión y establecimiento de la infección por VIH-1 independientemente de la ruta de transmisión (van't Wout *et al.* 1994, Connor *et al.* 1997, Schuitemaker *et al.* 1992), predominan durante la etapa asintomática (Pope *et al.* 2003) y se han asociado al fenotipo biológico NIS (Spijkerman *et al.* 1995, van't Wout *et al.* 1994). Las variantes X4-trópicas

emergen en un 40-60% de los individuos en etapas más avanzadas de la enfermedad, presentan un fenotipo viral IS y su aparición se ha asociado con una rápida caída de los linfocitos T CD4+ y con una progresión más rápida de la enfermedad (Schuitemaker *et al.* 1992, Brumme *et al.* 2005, Daar *et al.* 2007, Moyle *et al.* 2005, Koot *et al.* 1993, Tersmette *et al.* 1988, Richman *et al.* 1994) (figura 6). Sin embargo, este cambio de fenotipo viral no es imprescindible para la progresión de la enfermedad (Schuitemaker *et al.* 1992).

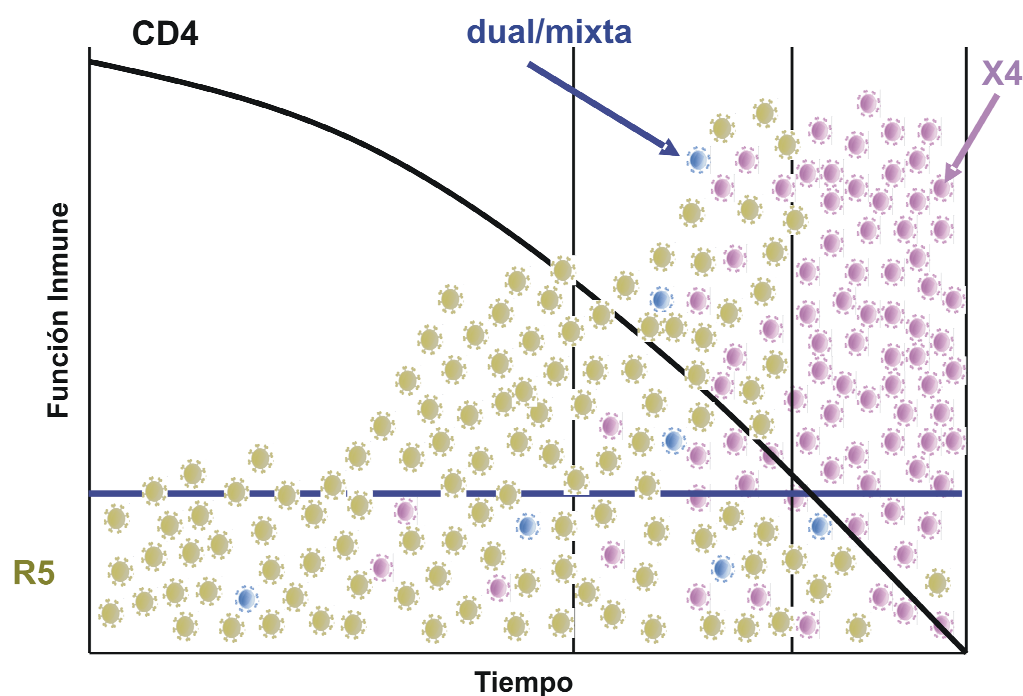


Figura 6. Evolución del tropismo viral a lo largo de la historia natural del VIH-1

No se conocen los factores que determinan la restricción de la infección por cepas R5-trópicas en etapas iniciales de la infección. Sin embargo, diferencias

en la expresión de los correceptores CCR5 y CXCR4 en las células diana en el momento de la transmisión (Fear *et al.* 1998, Zaitseva *et al.* 1997), podrían explicar dicha restricción. El inicio de la infección podría deberse al transporte de partículas virales a los nódulos linfáticos a través de células dendríticas, (Moore *et al.* 2004, Pope *et al.* 2003) donde el virus podría pasar a las células T CD4+ activadas que expresan más CCR5 que CXCR4, y por tanto los virus R5-trópicos podrían infectar un mayor número de células inmediatamente después de la transmisión que los virus X4, independientemente de la ruta a través de la cual el virus llegue a los nódulos linfáticos.

La replicación preferente del VIH-1 en el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal (GALT), también podría explicar la prevalencia de virus R5-trópicos en etapas iniciales de la infección, independientemente de la ruta de transmisión del virus. El GALT es el mayor reservorio de células memoria T CD4+ que expresan CCR5 (CD4+RO+CCR5+), y el principal sitio de replicación del VIH-1 en macacos y humanos (Veazey *et al.* 1998, Harouse *et al.* 1999, Brenchley *et al.* 2004, Mehandru *et al.* 2004, Li *et al.* 2005, Mattapallil *et al.* 2005). Por tanto, la abundancia de células memoria CD4+RO+CCR5+, podría favorecer la replicación temprana de virus R5 independientemente de la ruta de transmisión a través del cual el virus alcance el tejido linfoide.

Diversos estudios han mostrado la importancia del correceptor CCR5 en la infección y patogénesis del VIH-1. La delección de 32 pares de bases en el gen

ccr5 en homocigosis, disminuye significativamente, aunque no elimina por completo, el riesgo de infección por VIH-1 (Huang *et al.* 1996, Liu *et al.* 1996, Samson *et al.* 1996, Theodorou *et al.* 1997, Biti *et al.* 1997, Dean *et al.* 1996), mientras que en heterocigosis, se ha asociado con una menor tasa de progresión a SIDA (Huang *et al.* 1996, Moore *et al.* 1997, van Rij *et al.* 1999), lo que también sugiere la selección preferente de variantes R5-trópicas durante la transmisión viral y el establecimiento de la infección. Estudios previos han mostrado que individuos homocigotos portadores del polimorfismo *CCR5*Δ32 pueden infectarse con variantes X4-trópicas (O'Brien *et al.* 1997, Michael *et al.* 1998, Sheppard *et al.* 2002), lo que demuestra que estas variantes pueden ser transmitidas. El hecho de que las infecciones por variantes X4-trópicas se produzcan en raras ocasiones demuestra, que estas variantes virales presentan una desventaja comparadas con virus R5-trópicos para el establecimiento de nuevas infecciones.

Aunque las variantes virales X4, son poco prevalentes durante las primeras fases de la infección (Roos *et al.* 1992), a medida que la infección por VIH-1 progresa, se ha observado una evolución en el fenotipo viral de variantes R5 a DM y X4, cambio asociado a una evolución en el uso del correceptor de *CCR5* a *CXCR4* (Connor *et al.* 1997). Los mecanismos celulares y moleculares responsables del cambio a cepas más patogénicas todavía no están claros. El bajo número de mutaciones en la región V3 necesarias para provocar el cambio en el uso del correceptor (Pastore *et al.* 2004, Mosier *et al.* 1999,

Chesebro *et al.* 1996, Bozzette *et al.* 1993) y la elevada tasa de mutación y recombinación en el genoma del VIH-1, podrían favorecer la rápida y frecuente evolución de variantes X4 (Connor *et al.* 1993, Liu *et al.* 2002). Sin embargo, esto no es lo observado en pacientes infectados, por lo que debe haber una presión selectiva negativa de variantes X4 que impida el cambio en el uso del correceptor. Las diferencias de disponibilidad de las células diana para las distintas poblaciones virales (Douek *et al.* 2003), así como el cambio en los niveles de expresión de CCR5 y CXCR4 a lo largo de la infección por VIH-1 (van Rij *et al.* 2003), favoreciendo el uso de CXCR4 en etapas más avanzadas de la enfermedad y por tanto la aparición de variantes X4-trópicas, podría explicar este cambio en el uso del correceptor. Por último, la disfunción gradual del sistema inmune a medida que avanza la enfermedad (Schellekens *et al.* 1990) evitando el reconocimiento efectivo inicial de las variantes X4-trópicas (Tersmette *et al.* 1990, Miedema *et al.* 1990), llevaría a una disminución de la presión ejercida por el sistema inmune frente a virus X4-trópicos, favoreciendo su emergencia.

Actualmente no está claro si la aparición de cepas X4-trópicas es causa o consecuencia de la disminución de la cifra de linfocitos T CD4+. Se desconoce si las variantes X4-trópicas son naturalmente más patogénicas y directamente responsables de la progresión de la enfermedad o si la emergencia de dichas variantes podría ser una consecuencia de la progresiva disfunción inmune (Shaheen *et al.* 2004).

1.6. IMPACTO DE LA TERAPIA ANTIRRETROVIRAL EN EL TROPISMO VIRAL Y EN LA EXPRESIÓN DEL CORRECEPTOR CCR5 A NIVEL CELULAR

El uso de TARGA en pacientes VIH-1 ha modificado drásticamente el curso natural de la infección por VIH-1 (Palella *et al.* 1998), aproximando la esperanza de vida en personas infectadas en países occidentales a la de personas no infectadas. Sin embargo, la influencia de TARGA en la selección de variantes X4-trópicas podría modificar el ideal establecido sobre el beneficio indefinido que presenta TARGA.

Existen resultados controvertidos respecto al impacto que TARGA pudiera tener en la emergencia de variantes X4-trópicas y por tanto en el cambio en el uso del correceptor de CCR5 a CXCR4. Estudios previos han asociado la emergencia de variantes X4-trópicas con el uso del tratamiento antirretroviral (Johnston *et al.* 2003, Delobel *et al.* 2005) sugiriendo que TARGA podría facilitar las condiciones necesarias que permiten la emergencia gradual de variantes virales X4-trópicas a lo largo de la infección. Sin embargo, otros estudios han mostrado que el uso de TARGA podría retrasar la selección de variantes X4-trópicas (Skrabal *et al.* 2003, Galán *et al.* 2004).

Si TARGA induce el cambio en el uso del correceptor de CCR5 a CXCR4, está por evaluar. Según la historia natural de la infección por VIH-1, se ha observado un cambio fenotípico en la evolución de las variantes virales en

aproximadamente el 40-60% de los pacientes. Por ello, cabe esperar que la mitad de los individuos infectados por variantes R5 en el momento basal mantuvieran el fenotipo independientemente del desarrollo de la enfermedad y del fracaso al tratamiento antirretroviral. Por tanto, es difícil evaluar si fracasos repetidos al tratamiento tienen algún impacto en el curso natural del desarrollo de variantes fenotípicas del VIH-1. En un estudio longitudinal llevado a cabo recientemente en 40 pacientes mult fracasados se observó, que fracasos recurrentes a TARGA no parecen ser predictivos del cambio en el uso del correceptor (Lehmann *et al.* 2006).

El análisis de la expresión de CCR5 en pacientes VIH-1 vs individuos VIH-1 negativos, ha mostrado una regulación al alza en la expresión de CCR5 en pacientes VIH-1 positivos (Ostrowski *et al.* 1998). Existe una asociación directa entre el nivel de expresión del receptor de quimiocinas CCR5, y la progresión de la infección por VIH-1, de modo que individuos que expresan un elevado número de moléculas de CCR5 en la superficie de linfocitos T CD4+ tienden a mostrar elevadas cargas virales (Reynes *et al.* 2000), una mayor activación inmune (Ostrowski *et al.* 1998) y un número bajo de linfocitos T CD4+ (de Roda Husman *et al.* 1999). Sin embargo, apenas existen datos sobre el efecto de TARGA en la expresión de CCR5 en los linfocitos T. Si la regulación al alza de CCR5 está ligada al fenómeno de activación inmunológica inducida por la replicación viral, sería esperable un descenso en la expresión de CCR5 en pacientes con TARGA y carga viral suprimida, como consecuencia de la

disminución en el nivel de activación inmune que acompaña al control de la replicación viral (Benito *et al.* 2005). Estudios previos, han mostrado de hecho una disminución de la expresión de CCR5 en pacientes en tratamiento (Smith *et al.* 2002, Giovanetti *et al.* 1999). Sin embargo, no todos los estudios han mostrado una variación en la expresión de CCR5 en pacientes VIH-1 después de tomar TARGA, indicando que el nivel de expresión del correceptor, podría ser inherente a cada individuo (Reynes *et al.* 2000). La aprobación de maraviroc, el nuevo antagonista de CCR5, hace necesario estudiar la posible influencia de TARGA en el nivel de expresión de CCR5 de las células infectadas. Diferencias en dicha expresión, podrían influir en la actividad antiviral de estos compuestos debido a su mecanismo de acción (Lin *et al.* 2007).

1.7. IMPLICACIONES DEL TROPISMO VIRAL EN LA ERA DE LOS ANTAGONISTAS DE CCR5 Y CXCR4

Los antagonistas de los correceptores CCR5 y CXCR4, representan una nueva familia de fármacos que inhiben la entrada viral. Maraviroc (MVC), (CelsentriTM), es el primer antagonista de CCR5 aprobado por la FDA (Food and Drug Administration, USA) (Anonymous 2007), para el tratamiento de la infección por VIH-1 en adultos infectados con variantes virales R5-trópicas, resistentes a múltiples fármacos antirretrovirales. Los estudios MOTIVATE-1 y MOTIVATE-2 demostraron que pacientes mult fracasados con viremia

detectable, que tomaban MVC en combinación con una terapia optimizada recibiendo 150 o 300 mg una o dos veces al día, presentaban una respuesta virológica e inmunológica superior a la del grupo control que tomaba placebo, a 24 (Lalezari *et al.* 2007, Nelson *et al.* 2007) y 48 semanas de tratamiento (Hardy *et al.* 2008).

La eficacia de MVC en pacientes pretratados infectados con variantes virales D/M o X4-trópicas, ha sido evaluada en el estudio A4001029 (Mayer *et al.* 2006). No se observaron diferencias significativas en el nivel de descenso de viremia plasmática en el grupo que tomaba MVC, comparado con los pacientes que recibían placebo, destacando la limitada actividad antiviral de estos fármacos en pacientes infectados con variantes DM o X4 trópicas. Sin embargo, el grupo que tomaba MVC experimentó una mayor ganancia de linfocitos T CD4+ que el grupo placebo.

El estudio MERIT, evaluó la eficacia de MVC vs efavirenz (EFV) administrados en combinación con los análogos de nucleótido zidovudina y lamivudina, como terapia de inicio en pacientes naïve. Este estudio no ha podido demostrar hasta el momento la no inferioridad de MVC frente a efavirenz (EFV) para el objetivo de alcanzar una supresión de la viremia plasmática < 50 cop/mL (Saag *et al.* 2007).

MVC ha sido aprobado para el tratamiento de pacientes VIH positivos infectados por variantes R5-trópicas con experiencia previa a TARGA. Actualmente, existen otros antagonistas en fases avanzadas de su desarrollo clínico como es el caso de Vicriviroc (VCV).

1.8. HERRAMIENTAS PARA DETERMINAR EL TROPISMO VIRAL EN LA PRÁCTICA CLÍNICA

A pesar de la relación establecida entre el uso del correceptor y la progresión de la enfermedad en pacientes VIH-1, la determinación del tropismo viral no se ha utilizado como un parámetro habitual de seguimiento clínico de los pacientes con infección por VIH. Sin embargo, la introducción de los antagonistas de CCR5 dentro de la terapia antirretroviral, y su limitada actividad antiviral para variantes R5-trópicas, requiere del conocimiento previo del uso del correceptor en cada paciente, antes de la prescripción clínica de dichos fármacos.

Existen diversos métodos fenotípicos y genotípicos para determinar el tropismo del VIH-1 (tabla 3). El ensayo con la línea celular MT-2, fue ampliamente utilizado a finales de los años 80. Este ensayo determina el efecto citopático de los aislados virales, estableciendo la clasificación de las cepas virales como IS y NIS. El ensayo MT-2 se basa en que estas células expresan únicamente en su superficie celular el correceptor CXCR4 y no el CCR5, de modo que la

replicación viral refleja de un modo indirecto la presencia de virus X4 (Koot *et al.* 1992). La principal desventaja de este ensayo es la necesidad de *stocks* virales a partir de CMSP de los pacientes (Hosoya *et al.* 2006, Louder *et al.* 1999), proceso laborioso que requiere personal cualificado, lo que limita el uso de este ensayo para la determinación del tropismo en la práctica clínica.

Más recientemente, se han comercializado líneas celulares para la determinación del tropismo viral. Las células GHOST, constituyen una línea celular derivada del osteosarcoma humano (HOS) que expresa en su superficie celular CD4 y varios receptores de quimiocinas (CCR5, CCR3, CCR5, CXCR4 (Louder *et al.* 1999). Por otro lado, la línea celular U87, derivada de un glioma maligno, ha sido modificada genéticamente para expresar CD4 y varios receptores de quimiocinas en su superficie celular (Princen *et al.* 2004). U87 es actualmente la línea celular más utilizada para determinar el tropismo del VIH, ya que presenta algunas ventajas frente a otros tipos celulares como las células GHOST. Una de esas ventajas es su capacidad para crecer en superficies sólidas, lo cual es preferible a los cultivos en suspensión para muchos métodos de detección. Además, las células U87 sostienen una elevada replicación del VIH-1, manteniendo de forma estable los niveles de expresión de los distintos receptores celulares, circunstancia que tiende a desaparecer en otros tipos celulares. Entre las desventajas del uso de líneas celulares para determinar el tropismo viral hay una de especial relevancia. Los niveles de expresión de los receptores situados en la superficie celular, podrían diferir de

los presentes en las dianas naturales para el VIH-1, y por tanto no reflejar lo que ocurre *in vivo* (Coakley *et al.* 2005).

El interés por los estudios de tropismo ha aumentado desde que se iniciaron los ensayos clínicos con antagonistas de CCR5. Este hecho ha favorecido el diseño de nuevos ensayos para determinar el tropismo viral. En la actualidad, se han desarrollado diversos métodos fenotípicos para la determinación del tropismo basados en virus recombinantes disponibles para uso clínico o en desarrollo.

El ensayo de *Trofile* (Monogram Biosciences) ha sido y es extensamente utilizado para determinar el tropismo viral en todos los ensayos con antagonistas de correceptores incluyendo MVC y VCV. Por tanto, actualmente, es el único método validado para la determinación del tropismo en la práctica clínica y por ello, actualmente, es el que se utiliza para determinar el uso del correceptor en todos aquellos pacientes que planean iniciar MVC como parte de su terapia antirretroviral. Estos ensayos fenotípicos amplifican el gen de la glicoproteína de la envuelta a partir de muestras de plasma de pacientes infectados, para producir virus recombinantes con replicación competente o replicación defectiva. Los virus generados son usados para infectar líneas celulares que expresan CD4 y uno de los correceptores, CCR5 o CXCR4, lo que permite determinar el tropismo viral. El gen indicador utilizado en cada

método, permite clasificar a los distintos aislados virales como R5-trópicos, X4-trópicos o aislados dual-mixtos (Kuhmann *et al.* 2005).

Los ensayos basados en virus recombinantes permiten estudios a gran escala, lo cual no era posible utilizando los clásicos ensayos de cultivo celular a partir de aislados virales derivados de CMSP de pacientes. Sin embargo, el principal problema que presentan radica en el límite de detección de cepas minoritarias X4-trópicas presentes en la población viral de un individuo.

La presencia de variantes X4 en el momento basal por debajo del límite de detección del ensayo de *Trofile* se ha relacionado con fracaso virológico durante el tratamiento con antagonistas de CCR5. El límite de detección para variantes virales minoritarias en el ensayo de *Trofile* oscilaba del 5-10%. Sin embargo, mejoras recientes en dicho ensayo, han permitido un aumento de la sensibilidad, pudiendo detectar variantes minoritarias presentes en la población viral por debajo del 1%. (Reeves *et al.* 2007).

Por último, el tropismo viral se puede determinar a través de métodos genotípicos basados en algoritmos matemáticos que predicen el fenotipo viral (IS/NIS) o el uso del correceptor (X4/R5) de los aislados virales. La región V3 de la glicoproteína de la envuelta gp120 es el principal determinante del tropismo del VIH-1 por los receptores de CCR5 y CXCR4.

Método	Metodología	Limitaciones
MT-2	Capacidad de los aislados virales de formar sincitios en células MT-2	Obtención de los aislados virales
Líneas celulares	Capacidad de los aislados primarios o virus recombinantes de replicar en líneas celulares que expresan los receptores CCR5 y CXCR4 en su superficie	Diferentes niveles de correceptores entre las líneas celulares y las dianas naturales del VIH
Virus recombinantes	Trofile (Monogram Biosciences, San Francisco, CA, USA) PhenoScript™ (Eurofins-VirAlliance, Kalamazoo, MI, USA) Antivirogram (Virco BVBA, Mechelen, Bélgica) PhenX-R (InPheno, Basel, Suiza) Veritrop (Dyagnostic Hybrids, Cleveland, OH, USA) Tropitest HIV (Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España)	Umbral de detección de virus X4 en una población mixta de virus (R5+X4). Necesidad de instalaciones y personal cualificado para su desarrollo en centros de referencia.
Predicción del fenotipo en la región V3	Identificación de residuos en V3 que influyen fuertemente el uso viral del correceptor	Baja sensibilidad para la detección de variantes X4. Pocos datos que relacionan el fenotipo virtual y el fenotipo real

Tabla 3. Metodología para la determinación del tropismo viral. Principales obstáculos para su introducción en la práctica clínica.

En los últimos años, varios grupos han analizado la variabilidad natural en secuencias del dominio V3, y han identificado residuos de interés y patrones que pueden predecir el fenotipo de una determinada cepa viral por el uso del

receptor de quimiocinas. Con estos datos, se han diseñado varios algoritmos que permiten predecir el uso del correceptor del VIH-1 basándose en la secuencia genética de la región V3 de un determinado aislado viral (Jensen *et al.* 2003). La “regla 11/25” es la primera herramienta genotípica descrita que identifica a una variante como X4-trópica por la presencia de aminoácidos básicos en las posiciones 11 y/o 25 de la región V3 (De Jong *et al.* 1992). Sin embargo, actualmente existen algoritmos más complejos que utilizan diferentes métodos estadísticos para evaluar distintas posiciones y patrones de aminoácidos de la región V3 con el fin de mejorar el valor predictivo. Algunos están disponibles en páginas *web* de libre acceso (tabla 4). La utilización de herramientas genotípicas evita la necesidad de obtener aislados virales primarios o la generación de virus recombinantes; en este caso, es suficiente con amplificar y secuenciar la región V3 de la envuelta del VIH-1 a partir de ARN extraído de plasma o de ADN extraído de CMSP. En la actualidad, existe un especial interés en conocer la exactitud y concordancia entre las herramientas genotípicas y las fenotípicas.

- *wetcat*: (<http://genomiac2.ucsd.edu:8080/wetcat/v3.html>) (Pillai *et al.* 2003)
- *PSSM* (<http://ubik.microbiol.washington.edu/computing/pssm/>) (Jensen *et al.* 2003).
- *geno2pheno* (<http://coreceptor.bioinf.mpi-sb.mpg.de/cgi-bin/coreceptor.pl>) (Sing *et al.* 2004)

Tabla 4. Páginas *web* de acceso público que predicen el uso del correceptor del VIH basándose en la secuencia genética de la región V3.

OBJETIVOS

El tropismo del VIH-1 por los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4 se ha relacionado desde hace años con la patogénesis de la infección. A pesar de ello, la carga viral y el recuento de linfocitos T CD4⁺ continúan siendo los parámetros más utilizados para el seguimiento clínico de los pacientes VIH⁺. Los estudios de tropismo han adquirido una especial relevancia desde la introducción de fármacos para el tratamiento de la infección por VIH que bloquean la entrada del virus en la célula, uniéndose selectivamente a los receptores CCR5 o CXCR4. La familia de los antagonistas de CCR5, representada hasta el momento por maraviroc (MVC), ya forma parte del conjunto de fármacos disponibles para el tratamiento de la infección por VIH. En consideración de la dinámica del tropismo viral en pacientes VIH⁺ a lo largo de la infección, y el mecanismo de acción que presenta esta nueva familia de fármacos, inhibiendo exclusivamente la replicación de variantes R5-trópicas, se plantean los siguientes objetivos:

1. Evaluar la utilidad de herramientas genotípicas para la determinación del uso del correceptor en muestras clínicas de pacientes VIH⁺, tomando como referencia los resultados obtenidos mediante ensayos fenotípicos basados en virus recombinantes.
2. Caracterizar la prevalencia de variantes X4-trópicas en pacientes VIH⁺ en diferentes estadios de la infección por VIH.

3. Analizar la evolución del tropismo viral en pacientes naïve y en pacientes que inician tratamiento antirretroviral, con el fin de valorar el impacto del tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) sobre el tropismo viral.
4. Evaluar la influencia de la supresión de la replicación del VIH con TARGA en la expresión del correceptor CCR5 en linfocitos T CD4+ y T CD8+, y en las subpoblaciones linfocitarias naïve y memoria. Cualquier interacción podría modificar la actividad antiviral de los antagonistas de CCR5.

PACIENTES Y MÉTODOS

3.1. Pacientes

Los pacientes incluidos en esta tesis fueron seleccionados de forma retrospectiva a través de la base de datos del Hospital Carlos III de Madrid. Los pacientes seleccionados fueron pacientes VIH-1+ en seguimiento clínico en el Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Carlos III y que pudieron ser clasificados en una de las siguientes categorías:

A. Seroconvertores recientes: sujetos con evidencias de infección aguda (viremia plasmática detectable junto con un test de anticuerpos frente a VIH indeterminado o negativo); reactividad al ensayo Combo con resultado positivo para la detección de antígenos y negativo para los anticuerpos; o seropositividad para la infección por VIH-1 (mediante ELISA y un Western blot), habiendo obtenido resultados negativos en un test VIH negativo previo realizado durante los 12 meses anteriores.

B. Naïve: individuos VIH-1 positivos, con infección determinada durante más de 3 años, que nunca habían sido expuestos al tratamiento antirretroviral.

C. Pretratados: pacientes VIH-1 positivos en tratamiento, con resistencias documentadas a más de un miembro de cada una de las familias de antirretrovirales: ITIAN (inhibidores de la transcriptasa inversa análogo de nucleósidos), ITINAN (inhibidores de la transcriptasa inversa no análogo de nucleósidos), IP (inhibidores de la proteasa) o IF (inhibidores de la fusión),

habiendo sido expuestos a fármacos antirretrovirales durante más de 3 años y en la actualidad en situación de fracaso virológico.

3.2. Obtención de plasma

Las muestras de plasma se obtuvieron a partir de sangre de los pacientes por punción venosa en tubos Vacutainer conteniendo EDTA (ácido etilendiamin tetraacético) como anticoagulante. El plasma libre de células fue aislado por centrifugación a 800 x g durante 10 minutos (min). Las muestras de plasma fueron divididas en alícuotas de 1,5 mililitros (mL) y almacenadas a -20° C hasta su posterior uso.

3.3. Viremia plasmática

La viremia plasmática se cuantificó utilizando un ensayo comercial (branched DNA assay Versant 440, Siemens Medical Solutions, Barcelona, España) con un límite de detección inferior de 50 copias de ARN-VIH por mililitro y cuyo rango lineal oscila de 50 a 75.000 cop/mL.

3.4. Recuento de linfocitos T CD4+

El recuento de linfocitos T CD4+ se realizó mediante marcaje directo en sangre total (Beckman-Coulter, Miami, FL). La cuantificación se realizó por citometría de flujo utilizando un citómetro de flujo FC500 (Coulter Instruments, Miami, FL,

USA), y se expresó en forma de cifra absoluta por microlitro (μL) de sangre y como porcentaje respecto al total de linfocitos circulantes.

3.5. Extracción del ARN viral

La extracción de ARN se llevó a cabo a partir de 500 μL del plasma obtenido previamente y mediante el kit comercial QIA[®] RNA Blood Mini kit (50) (Qiagen, Hilden, Alemania). El ARN obtenido (60 μL) se almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior uso.

3.6. Análisis genético del gen *pol* y de la región gp41 del gen *env*

Ambos análisis se llevaron a cabo a partir de ARN-VIH extraído del plasma. El análisis genético del gen *pol* incluyó las regiones de la transcriptasa inversa y de la proteasa. Dicho análisis se realizó mediante secuenciación automática (ABI Prism 3100; Celera Diagnostics) utilizando los kit comerciales Viroseq HIV-1 Genotyping System v2.0 (Abbott Laboratorios, Chicago, IL, USA) y TRUGENE HIV-1 Genotyping Kit (Siemens Medical Solutions, Barcelona, España).

El análisis genético del gen *env* se llevó a cabo amplificando un fragmento de 567 nucleótidos de la región gp41 del gen de la envuelta que incluía la regiones HR1 y HR2, mediante una RT-nested-PCR utilizando los siguientes oligonucleótidos: E41 ext-1 (5' GAGAAGAGTGGTGCAGAGAG 3') y

E41ext-2 (5' ATTCCTTCGGGCCTGTCTGGG 3') como cebadores externos y E41int-1 (5' GCAGCAGGAAGCACTATGGGCG 3') y E41int-2 (5' GGTGARTATCCCTGCTAACTC 3') como cebadores internos. Las condiciones de la amplificación para la RT-PCR fueron las siguientes: 48 °C - 45 min, 94 °C - 2 min, 94 °C - 15 segundos (seg) / 50 °C - 30 seg / 72 °C - 30 seg (40 ciclos), 72 °C - 30 seg, 4 °C - ∞. El ADN obtenido fue amplificado mediante el uso del kit comercial Master Mix PCR System (Promega, Madison, WI, USA) a partir de 5µl del producto obtenido en la RT-PCR. Las condiciones para la nested-PCR fueron: 94 °C - 3 min, 94 °C - 30 seg/ 55 °C - 30 seg/ 72 °C - 1 min (40 ciclos), 72 °C - 7 min, 4°C - ∞ (Poveda *et al.* 2002).

3.7. Análisis genético de la región V3 de la envuelta viral

El análisis genético de la envuelta viral se realizó a partir de ARN-VIH extraído de plasma de cada paciente. Tras la obtención de ARN viral se llevó a cabo la amplificación de la región V3 de gp120 de 105 nucleótidos por nested-PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes: RT-PCR: 48 °C - 45 min, 94 °C - 2 min, 94 °C - 15 seg / 55 °C - 30 seg / 72 °C - 30 seg (35 ciclos), 72 °C - 30 seg, 4 °C - ∞; Nested-PCR: 94 °C - 3 min, 94 °C - 30 seg/ 55 °C - 30 seg/ 72 °C - 1 min (35 ciclos), 72 °C - 7min, 4°C- ∞. Los oligonucleótidos específicos empleados para la determinación de la secuencia de V3 fueron: E80 (5' CCAATTCCCATACATTATTGTG 3') y E105 (5' GCTTTTCCTACTTCCTGCCAC 3') como cebadores externos y ES7 (5' CTGTTAAATGGCAGTCTAGC 3') y E125 (5'

CAATTTCTGGGTCCCCTCCTGAGG 3') como cebadores internos. Los oligonucleótidos utilizados fueron cedidos por M. Quiñones-Mateu (Dyagnostic Hybrids, Cleveland, OH)

3.8. Purificación del amplicón

El producto de la PCR (amplicón) fue visualizado mediante un gel de agarosa al 1% y fue purificado mediante el kit comercial GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham GE Healthcare Biosciences, UK).

3.9. Secuenciación del ADN

El producto de PCR purificado fue secuenciado en ambas direcciones mediante secuenciación automática utilizando el kit comercial ABI PRISM dRhodamine Dye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) en un secuenciador ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Los cebadores utilizados en la reacción de secuencia fueron los mismos que se utilizaron en la nested-PCR como cebadores internos, es decir, los oligonucleótidos E41int-1 (5' GCAGCAGGAAGCACTATGGGCG 3') y E41int-2 (5' GGTGARTATCCCTGCTAACTC 3') cuando se secuenció la región gp41 de la envuelta, y los oligonucleótidos ES7 (5' CTGTTAAATGGCAGTCTAGC 3') y E125 (5' CAATTTCTGGGTCCCCTCCTGAGG 3') en el caso de la secuenciación de la región V3.

Todas las secuencias se editaron utilizando el programa SeqScape Software v. 2.5 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Se consideró mezcla de nucleótidos cuando el pico más pequeño del electroferograma representaba al menos el 25% del área del pico principal. Los tripletes de nucleótidos que contenían mezclas fueron traducidos a cada uno de los posibles aminoácidos. Para cada muestra, todas las diferentes secuencias de V3 generadas como consecuencia de todas las posibles combinaciones de aminoácidos, fueron consideradas para la determinación del tropismo.

Las mutaciones de resistencia de cada paciente en el gen *pol* se analizaron utilizando el kit comercial estandarizado para el análisis de resistencias en TI y PR ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System (Applied Biosystems, Foster City, CA).

3.10. Determinación genotípica del uso del correceptor

La determinación genotípica del uso del correceptor en los distintos aislados virales se llevó a cabo para cada muestra usando los predictores genotípicos virtuales **wetcat**, **geno2pheno**_[coreceptor] y **PSSM** disponibles *online* (tabla 4) que se describen a continuación en más detalle:

Wetcat. Alberga diferentes clasificadores: C4.5, C4.5p8p12, PART, SVM (*Support Vector Machine*) y la “regla 11/25”. Estos clasificadores se basan en

distintos algoritmos, que evalúan distintas posiciones y patrones de aminoácidos de la región V3 con el fin de mejorar su valor predictivo. Las secuencias deben ser alineadas de modo manual, según la secuencia consenso “CTRPNNNT-RK*I*I--GPG*AFY*-TG*I-IGDIRQAHC”. Los asteriscos (*) indican que puede haber cualquier aminoácido en esa posición, y los guiones (-) que debe haber un espacio entre aminoácidos. El número total de posiciones de cada secuencia debe ser 40, de modo que secuencias de V3 con más o menos de 35 aminoácidos fueron modificadas eliminando o incluyendo guiones en las posiciones adecuadas hasta conseguir un total de 40 posiciones en cada una de las secuencias. El fichero creado con las secuencias alineadas con formato FASTA, se insertó en el clasificador SVM, debido a que ha demostrado ser el método más exacto (90,86%) para la predicción del uso del correceptor (Pillai *et al.* 2003). SVM, es un método de aprendizaje estadístico que clasifica las secuencias de V3 de un modo binario, es decir, como secuencias R5 o X4, incluyendo las secuencias R5/X4 como secuencias X4. Una de las ventajas de *wetcat* es que permite incluir todas las secuencias V3 de una sola vez, independientemente del número de secuencias incluidas en el archivo. Sin embargo, el formato restrictivo en el que tienen que ser presentadas las secuencias requiere de bastante tiempo. La validación de *wetcat*, se llevó a cabo utilizando 271 secuencias, con resultados genotípico-fenotípicos pareados: 168 secuencias fueron CCR5-trópicas y 103 secuencias CXCR4-trópicas. La actualización de esta técnica con un mayor grupo de datos, podría mejorar la predicción del tropismo viral.

Geno2pheno_[coreceptor]. Las predicciones se realizan basándose en el algoritmo *support vector machine* (SVM) (Sing *et al.* 2004), al igual que uno de los clasificadores de *wetcat*. El uso del correceptor puede determinarse a través de las secuencias de nucleótidos o de aminoácidos, pudiendo incorporarlas directamente a la web o insertándolas a través de un fichero en formato FASTA y alineándolas con la secuencia V3 del aislado de referencia HXB2. Este predictor permite elegir el nivel de sensibilidad y especificidad. El valor máximo de sensibilidad elegido para el reconocimiento de variantes X4 en nuestro análisis fue 0,80 y la especificidad 0,10. La versión 2.0 de *geno2pheno_[coreceptor]*, ha sido validada con 1100 secuencias pareadas genotipo-fenotipo (769 CCR5-trópicas, 210 CXCR4-trópicas y 131 dual/mixtas, incluyendo las variantes virales dual/mixtas como variantes CXCR4-trópicas). Los parámetros clínicos carga viral, número de linfocitos T CD4+ y T CD8+ en valor absoluto, porcentaje de linfocitos T CD4+ y genotipo de CCR5 pueden ser incluidos junto con la secuencia de V3. Este predictor, incluye un valor “p” que evalúa el grado de confianza de la predicción. *Geno2pheno_[coreceptor]* no está restringido a un único subtipo. Aunque la mayoría de las secuencias usadas para valorar la técnica pertenecen a virus subtipo B, también se han incluido secuencias con otros subtipos genéticos en el proceso de valoración.

PSSM. A diferencia de *wetcat* y *geno2pheno_[coreceptor]*, *PSSM* no sólo predice si un virus puede usar el correceptor CXCR4 o no, sino que da información adicional de las predicciones, interpretando la tendencia a utilizar CXCR4 como

baja, intermedia y alta para virus R5, R5/X4 y X4 respectivamente (Jensen *et al.* 2003) y por tanto, puede actuar como indicador continuo de la evolución de variantes X4. Existen dos matrices generadas para la clasificación variantes virales subtipo B: la primera generada con secuencias fenotípicas del uso del correceptor conocidas (matriz X4-R5), y la segunda generada en función de la capacidad de las variantes virales de inducir sincitios (matriz IS-NIS) en la línea celular MT-2. Una tercera matriz ha sido generada con variantes del subtipo genético C, según su capacidad para inducir sincitios (IS-NSI).

En nuestro estudio, la clasificación de las variantes virales según el uso del correceptor se realizó a través de la matriz X4-R5. La validación de *PSSM* se llevó a cabo con 213 secuencias con genotipo-fenotipo pareado (17 CXCR4-trópicas, 168 CCR5-trópicas, y 28 dual/mixtas) y 257 secuencias (70 IS y 187 NIS). Una ventaja de este predictor es que puede alinear 100 secuencias de la región V3 a la vez. Sin embargo, solamente existen matrices para secuencias subtipo B y subtipo C y por tanto no se aconseja la predicción en variantes con otros subtipos genéticos.

En todos los casos, las secuencias V3 obtenidas en nuestros estudios fueron clasificadas como secuencias de aislados R5 o X4.

En nuestro estudio, en el caso de muestras con más de una combinación posible de aminoácidos, la presencia de una única secuencia de V3 clasificada como X4 fue identificada como X4.

3.11. Determinación fenotípica del uso del correceptor

La determinación fenotípica del uso del correceptor en las distintas muestras de pacientes se llevó a cabo utilizando el ensayo fenotípico *PhenoScript* (Eurofins, Kalamazoo, Michigan, USA) (Labernardiere *et al.* 2004), basado en la tecnología de virus recombinantes. A partir del ARN viral obtenido del plasma de cada paciente, se amplificó la envuelta del genoma del VIH-1 por PCR. El amplicón obtenido, se cotransfectó en las células productoras (293T) junto al plásmido que portaba un clon del VIH-1 defectivo en la región de la envuelta. El virus recombinante obtenido se usó para infectar las células U373 que expresan CXCR4 o CCR5, junto al receptor CD4. La especificidad de la infección se evaluó en cada ensayo incubando las células indicadoras en presencia o ausencia de antagonistas de los correceptores y 5 controles portadores de secuencias de la envuelta derivadas de pacientes con distinto tropismo e infectividad.

3.12. Obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)

Las CMSP se obtuvieron a partir de las muestras de sangre total de los pacientes recogidas en tubos Vacutainer con EDTA mediante una

centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Histopaque (Sigma Chemical Co, St. Louis, Missouri, USA) a 1600 x g durante 30 min. La fracción que contenía las CMSP, se recogió y se lavó con tampón fosfato salino (PBS; Lonza, Verviers Bélgica) y se procedió al conteo de CMSP para la separación en alícuotas conteniendo un rango entre 5 y 10 millones de células.

Para su criopreservación, las CMSP se resuspendieron en 90% de SBF y 10% de DMSO. Las muestras de CMSP de cada paciente fueron mantenidas previamente a -80 °C durante las primeras 24 h y posteriormente en nitrógeno líquido hasta su procesamiento. Además se separaron alícuotas de 1 millón de CMSP que se conservaron en *pellet* seco, para la extracción de material genético a -20 °C hasta su posterior uso.

En el momento del análisis las CMSP fueron descongeladas en baño de agua a 37°C y se resuspendieron en R10. La viabilidad de las células fue siempre superior al 85%.

3.13. Extracción del ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo a partir de una alícuota de CMSP conservadas como *pellet* seco y usando el QIAamp® DNA Blood Mini kit (250) (Qiagen, Hilden, Alemania). El ADN obtenido (50 µL) se almacenó a -20 °C hasta su posterior uso.

3.14. Determinación genotípica del receptor CCR5 (*CCR5*Δ32)

El genotipo para la delección de 32 pb del receptor de quimiocinas CCR5 se analizó en ADN celular extraído en pacientes naïve y pretratados. No se dispusieron de CMSP de pacientes seroconvertores por lo que en este grupo no se pudo determinar este parámetro. La presencia del polimorfismo se analizó mediante una PCR específica utilizando los siguientes oligonucleótidos: CCR5-D (5' CCTGGCTGTCGTCCATGCTG 3') como cebador directo y CCR5-I (5' CCAGCAGCGGCAGGACCAGC 3') como cebador inverso (Samson *et al.* 1996). El producto de PCR fue visualizado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2,5%: wt/*CCR5*Δ32 (fragmentos de 242 y 210 pb); *CCR5*Δ32/*CCR5*Δ32 (fragmento de 210 pb); wt/wt (fragmento de 242 pb).

3.15. Determinación del nivel de interleuquina 7 (IL-7) en plasma

La cuantificación de la IL-7 en plasma se llevó a cabo utilizando un kit ELISA comercial ultrasensible (Quantikine[®] HS Immunoassay; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), con un nivel de sensibilidad de 0,1 pg/mL. Se añadieron 200 µL de cada muestra a una placa de 96 pocillos que contenía un anticuerpo monoclonal específico para la IL-7. Las muestras se incubaron durante 14-20 horas a temperatura ambiente y en condiciones de humedad. Tras 4 lavados, se añadieron 200 µL de anticuerpo policlonal específico para IL-7 conjugado a la enzima. Tras 2 horas de incubación, se procedió al lavado de los pocillos y se añadieron 50 µL de solución de sustrato. Tras incubar 45

minutos, se añadió la solución de revelado. Transcurridos 45 minutos se añadió la solución de parada de la reacción enzimática. La intensidad de color se midió a una absorbancia de 492/620 nm. La cantidad de producto coloreado es directamente proporcional a la cantidad de IL-7 unida en la etapa inicial.

3.16. Cuantificación de la expresión del correceptor CCR5 en distintas subpoblaciones de linfocitos T

La cuantificación de la expresión de CCR5 en las subpoblaciones naive (CD45RO-) y memoria (CD45RO+) de linfocitos T CD4+ y CD8+, se llevó a cabo utilizando el siguiente panel de anticuerpos monoclonales: CD4-ECD, CD8-PE/Cy5, CD45RO-PE (Beckmann-Coulter, Miami, FL), CCR5-FITC e IgG2 (Becton Dickinson Co). Se utilizó un ensayo cuantitativo de citometría de flujo a partir de CMSP congeladas, que permite cuantificar el número de moléculas CCR5 que se expresan por célula (Cellquant Calibrator, Biocytex, Marsella, Francia). El ensayo utiliza una curva estándar formada a partir de 4 grupos de bolitas sintéticas, que llevan unidas un número conocido de moléculas de IgG de ratón. Para el análisis de las muestras se empleó el citómetro de flujo FC500 (Beckman-Coulter).

En dos alícuotas que contenían 50.000 CMSP previamente descongeladas, se incubaron independientemente 10 μ l del anticuerpo monoclonal CCR5 y 5 μ L del control isotópico. A continuación se añadieron 10 μ L del anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón marcado con el fluorocromo FITC. El lavado de

células se realizó añadiendo 2 mL de solución de lavado y centrifugando durante 5 min a 300 x g. El *pellet* de células se resuspendió en 50 µL de solución neutralizante. Seguidamente, se añadieron 5 µL de los anticuerpos CD4-ECD, CD8-PE/Cy5 y CD45RO-PE y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente y en la oscuridad. A continuación se procedió con un segundo lavado y centrifugación (5 min; 300 x g). El *pellet* de células obtenido se resuspendió en 250 µL del tampón de lavado. Las muestras se analizaron inmediatamente en el citómetro de flujo. Para cada muestra se analizó un mínimo de 2.500 linfocitos T CD4+ y CD8+. A partir de la intensidad media de fluorescencia y el número de moléculas IgG de cada grupo de bolitas, se construyó una recta patrón que se empleó para convertir la intensidad media de fluorescencia obtenida para cada muestra en moléculas de CCR5.

La cuantificación de la expresión de CCR5 se llevó a cabo midiendo dos parámetros: el nivel de expresión, medido como la proporción de células CCR5+, y la densidad de expresión, medido como el número de moléculas/célula en la fracción de células CCR5+.

3.17. Análisis del nivel de activación en linfocitos T

La activación del sistema inmune se analizó cuantificando la intensidad de la expresión de la molécula CD38, definida como un marcador de activación celular. El nivel de expresión de CD38 en linfocitos T CD4+ y CD8+ se determinó utilizando un ensayo cuantitativo de citometría de flujo a partir de

CMSP, que permite cuantificar el número de moléculas CD38 que se expresan por célula (Cellquant CD38/CD8-PE, Biocytex, Marsella, Francia). El ensayo utiliza una curva estándar formada a partir de 4 grupos de bolitas sintéticas, que llevan unidas un número conocido de moléculas de IgG de ratón.

Se incubaron 2 alícuotas de 25 μ L de CMSP (conteniendo cada una 50.000 células) con el anticuerpo monoclonal anti-CD38 y con un control isotípico respectivamente, y una alícuota de 25 μ L de una suspensión de bolitas sintéticas con el control isotípico. Después se añadió a cada una de las muestras un anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón marcado con el fluorocromo FITC. A continuación, las muestras se incubaron con una solución neutralizante y finalmente (excepto el calibrador) con el siguiente panel de anticuerpos monoclonales: CD4-ECD y CD8-PE/Cy5. El tiempo de incubación con cada uno de los reactivos fue de 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, las células se lavaron 2 veces con un tampón de lavado y se resuspendieron en 250 μ L del mismo tampón. Para cada muestra se analizó un mínimo de 2.500 linfocitos T CD4+ y CD8+ en el citómetro de flujo FC500 (Beckton-Coulter). A partir de la intensidad media de fluorescencia y el número de moléculas IgG de cada grupo de bolitas, se construyó una recta patrón que se empleó para convertir la intensidad media de fluorescencia obtenida para cada muestra en moléculas de CD38.

3.18. Datos epidemiológicos y marcadores biológicos

Los datos epidemiológicos de los distintos pacientes recogidos para realizar esta tesis fueron el sexo, la edad, la ruta de transmisión y el año de infección. Los marcadores biológicos utilizados fueron la carga viral, el recuento de linfocitos T CD4+ y el nadir de linfocitos T CD4+. Otros parámetros analizados fueron: el tratamiento antiretroviral, la presencia de mutaciones de resistencia a las distintas familias de antirretrovirales, presencia del polimorfismo *CCR5*Δ32 y el tropismo viral.

3.19. Análisis estadístico

En los tres estudios, se comprobó la normalización de las distintas variables incluidas, mediante el test de Kolmogorov-Smirnov.

En el estudio 1, la comparación de medias de los parámetros analizados en los distintos grupos de pacientes se realizó mediante un test de la T de student.

En el estudio 2, las características basales de la población de estudio se recogieron como porcentajes, media \pm desviación estándar, o mediana \pm amplitud intercuartílica (AIQ). Las diferencias entre los tres grupos de pacientes se analizaron mediante un test de la T de student (para parámetros normales), o el test de la U de Mann-Whitney (para parámetros no normales). Las asociaciones entre variables se analizaron utilizando un test de chi-cuadrado

para variables cualitativas y un test de correlación de Pearson o Spearman para variables cuantitativas normales o no normales respectivamente.

En el estudio 3, se recogieron las características basales de la población de estudio como números absolutos, porcentajes y medias \pm desviaciones estándar para variables cuantitativas. La asociación entre variables cualitativas fue determinada mediante la chi-cuadrado de Pearson o el test exacto de Fisher. El test de la T de Student o los análisis de la varianza (ANOVA) se usaron para comparar las medias de variables cuantitativas de dos o más grupos, respectivamente. La asociación entre variables cuantitativas fue estudiada usando el coeficiente de correlación de Pearson. El tiempo de cambio en el uso del correceptor fue estimado mediante el método de Kaplan-Meier y los distintos subgrupos fueron comparados usando el test log-rank.

En el estudio 4, las características basales de la población de estudio se recogieron como porcentajes y mediana \pm amplitud intercuartílica (AIQ). Las diferencias entre grupos para las variables inmunológicas se analizaron mediante el test de la U de Mann-Whitney. Las diferencias entre los distintos momentos del seguimiento en el grupo de pacientes se analizaron mediante el test de Friedman. Las asociaciones entre variables se analizaron utilizando un test de chi-cuadrado para variables cualitativas y un test de correlación de Spearman para variables cuantitativas no normales.

En todos los estudios, se consideró estadísticamente significativo valores de $p < 0,05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico SPSS v 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTADOS

I. Estudio 1: Evaluación de herramientas genotípicas para la determinación del uso del correceptor en muestras clínicas, tomando como referencia un ensayo fenotípico basado en virus recombinantes.

4.1. Población de estudio

Se incluyeron un total de 83 pacientes con infección crónica por VIH-1: 37 eran pacientes naïve y 46 pacientes pretratados que habían fracasado a distintos regímenes terapéuticos y con viremia detectable en el momento de la selección. La media de viremia plasmática fue similar en ambos grupos de pacientes ($4,1 \pm 0,6$ vs $3,9 \pm 0,8$ log cop/mL; $p=0,21$, respectivamente). Sin embargo, la media de linfocitos T CD4+ fue significativamente mayor en pacientes naïve que en pacientes en tratamiento (437 ± 361 vs 246 ± 204 células/ μ L; $p<0,01$, respectivamente). Todos los pacientes incluidos en este estudio estaban infectados con variantes virales del subtipo genético B.

La determinación genotípica del tropismo se realizó con los predictores *wetcat-SVM*, *geno2pheno* y *PSSM-X4R5* en todas las muestras seleccionadas ($n=83$), mientras que el ensayo fenotípico *Phenoscript*, se realizó en un 94% de las muestras ($n=78$), debido a una falta en la disponibilidad de plasma para alguna muestra.

En pacientes que recibían terapia antirretroviral, el análisis de la prevalencia de variantes CXCR4-trópicas en función del predictor utilizado, fue de un 56,5%

cuando se utilizó el predictor *wetcat-SVM*, de un 50% con *geno2pheno* y de un 41,3% con *PSSM-X4R5*. Cuando se utilizó el ensayo fenotípico *Phenoscript*, la prevalencia de variantes X4-trópicas obtenida fue del 30,4%. En individuos que no recibían tratamiento, la prevalencia de variantes CXCR4-trópicas obtenida fue de un 43,2% cuando se determinió el correceptor mediante el predictor *geno2pheno*, de un 37,8% con *wetcat-SVM*, y de un 10,8% cuando se utilizó *PSSM-X4R5*. La prevalencia observada con *Phenoscript* fue del 15,6%. En la tabla 1 se encuentran resumidas la prevalencia de variantes X4-trópicas en función de los métodos empleados.

Métodos	Total	Pacientes con TARGA (n=46)			Individuos sin TARGA (n=37)		
		R5 (%)	X4 (%)	p	R5 (%)	X4 (%)	p
<i>Wetcat-SVM</i>	83	20 (43,5)	26 (56,5)	0,21*	23 (62,2)	14 (37,8)	0,036
<i>Geno2pheno</i>	83	23 (50)	23 (50)	>0,999	21 (56,8)	16 (43,2)	0,245
<i>PSSM-X4R5</i>	83	27 (58,7)	19 (41,3)	0,095	33 (89,2)	4 (10,8)	<0,001
<i>Phenoscript</i>	78	32 (69,6)	14 (30,4)	0,002	27 (84,4)	5 (15,6)	<0,001

* "p" obtenida al comparar el porcentaje de cepas R5 y X4-trópicas obtenido en cada uno de los predictores.

Tabla 1. Predicción del uso del correceptor en pacientes VIH-1 usando un método fenotípico y 3 herramientas bioinformáticas.

4.2. Concordancia entre métodos genotípicos y fenotípicos para la determinación del uso del correceptor

El nivel de concordancia más elevado para la determinación del tropismo entre el ensayo *Phenoscript* y los predictores genotípicos se obtuvo con el predictor *PSSM-X4R5* (85,9%), seguido de *geno2pheno* (71,8%) y de *wetcat-SVM* (70,5%). La sobreestimación de variantes CXCR4-trópicas por los métodos genotípicos, fue la principal causa de la discordancia observada entre *Phenoscript* y las distintas herramientas bioinformáticas. El mayor porcentaje de discordancia observado en cepas identificadas como CXCR4-trópicas por los predictores genotípicos, cuando *Phenoscript* las identificaba como variantes CCR5-trópicas, se observó en la herramienta *wetcat-SVM*, con un 26,9% de las muestras analizadas, seguido del predictor *geno2pheno* (24%) y por último, el predictor *PSSM-X4R5* (8,9%). Sin embargo, la discordancia observada en cuanto a la predicción de variantes CCR5-trópicas por métodos genotípicos, siendo identificadas como variantes CXCR4-trópicas según el ensayo fenotípico, fue menor resultando en un 2,5%, 3,8% y 5,1% de las muestras analizadas según *wetcat-SVM*, *geno2pheno* y *PSSM-X4R5* respectivamente (tabla 2).

La sensibilidad y especificidad observada en las herramientas bioinformáticas para la detección de variantes X4-trópicas, comparadas con el ensayo fenotípico *Phenoscript* fue del 89,5% y 64,4% para *wetcat-SVM*, 88,8% y 67,8% con *geno2pheno* y 78,9% y 88,1% para *PSSM* (tabla 2).

Métodos	N	R5	X4	Concordancia (%)	Discordancia R5/X4 ^a (%)	Discordancia X4/R5 ^b (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
<i>Wetcat-SVM</i>	83	43	40	70,5	2,5	26,9	89,5	64,4
<i>Geno2pheno</i>	83	44	39	71,8	3,8	24	88,8	67,8
<i>PSSM-X4R5</i>	83	60	23	85,9	5,1	8,9	78,9	88,1
<i>Phenoscript</i>	78	59	19	--	--	--	--	--

^aMuestras informadas como R5 por métodos genotípicos y X4 por métodos fenotípicos.

^bMuestras informadas como X4 por métodos genotípicos y R5 por métodos fenotípicos.

Tabla 2. Concordancia entre herramientas genotípicas (*wetcat*, *geno2pheno*, y *PSSM*) y el ensayo fenotípico *Phenoscript* para la determinación del uso del correceptor. Sensibilidad y especificidad de las herramientas genotípicas para la determinación de variantes X4-trópicas.

II. Estudio 2: Prevalencia de variantes VIH-1 según el uso del correceptor en diferentes etapas de la infección por VIH.

4.3. Población de estudio

Se seleccionaron un total de 206 pacientes VIH+ con viremia detectable: 67 seroconvertidores recientes, 52 pacientes naïve con infección crónica, y 87 pacientes en tratamiento antirretroviral que se encontraban en fracaso virológico. La media de carga viral en pacientes en tratamiento, fue significativamente más baja que en seroconvertidores recientes y pacientes naïve ($p < 0,001$). Sin embargo, el grupo de seroconvertidores presentó un mayor número de linfocitos T CD4 que pacientes naïve y pretratados ($p = 0,001$). En la tabla 3 se presentan éstas y otras características de la población de estudio.

4.4. Prevalencia de variantes R5 y X4-trópicas

La determinación del tropismo viral se realizó en un 95% ($n = 196$) de los 206 pacientes seleccionados, utilizando el predictor genotípico *PSSM*, ya que en el estudio anterior había demostrado la mejor concordancia con los resultados obtenidos mediante el ensayo fenotípico. El 21% ($n = 44$) de los pacientes, presentaron variantes X4-trópicas: un 9% ($n = 6$) en seroconvertidores recientes, un 15% ($n = 8$) en pacientes naïve y un 35% ($n = 30$) en los pacientes pretratados en fracaso virológico, observándose diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,009$) entre los distintos grupos de pacientes (tabla 3).

	Total (n=206)	Seroconvertidores (n=67)	Naïve (n=52)	Pretratados (n=87)	p
Hombres, n (%)	173 (84)	59 (88)	39 (75)	75 (86,2)	0,06
Tropismo X4, n (%)	44(21)	6 (9)	8 (15)	30 (35)	0,009
Ruta transmisión, n (%)					
UDVP	50 (24)	6 (9)	11 (21)	33 (38)	<0,001 0,007
Homosexuales	103 (50)	48 (72)	23 (44)	32 (37)	
Heterosexuales	38 (18)	9 (13)	15 (29)	14 (16)	
Otros	15 (7)	4 (6)	3 (6)	8 (9)	
Edad*, años	39 [10]	31 [10]	37[10]	42 [8]	<0,001
VIH-RNA[†], log cop/mL	4,1 (0,8)	4,4 (0,8)	4,2 (0,8)	3,8 (0,9)	<0,001
Linfocitos T CD4[†], células/μL	425 (267,6)	543,4 (246,1)	443,4 (315,8)	383,5 (233,9)	0,001
Mutaciones a ITIAN*	0	0	0	1 [4]	<0,0001
Mutaciones a ITINAN*	0	0	0	1 [2]	
Mutaciones a IP*	2 [3]	1 [1]	1 [1]	5 [7]	
Mutaciones a IF*	0	0	0	0	

* Mediana [amplitud intercuartílica]

† Media (desviación estándar)

Tabla 3. Características basales de población de estudio.

4.5. Asociación entre tropismo viral y características epidemiológicas

La determinación de la presencia de la delección $\Delta 32$ en el gen que codifica para el correceptor CCR5 (figura 1), pudo realizarse en un 97% (n=200) de los pacientes incluidos en el estudio. La prevalencia de la delección $CCR5\Delta 32$ fue del 9% en sujetos recientemente infectados, del 16% en pacientes naïve y del 13% en pacientes pretratados. No se observó ninguna asociación entre la presencia de la delección $\Delta 32$ en el gen *ccr5* y el tropismo viral ($p=0,55$) (tabla 4).

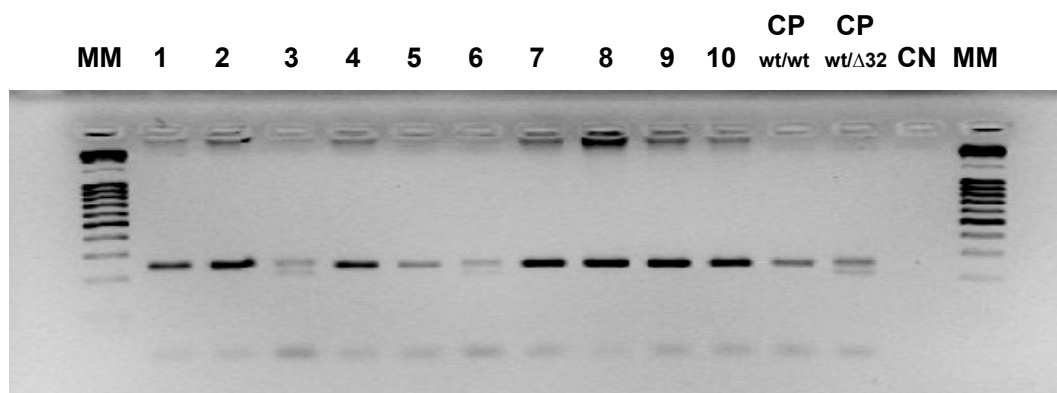


Figura 1. Gel de agarosa al 2,5%. El producto amplificado es un fragmento de 242 pb del gen que codifica para el correceptor CCR5. **Pocillos:** **MM:** marcador de peso molecular; **CP_{wt/wt}:** control positivo homocigoto *wild type* (wt); **CP_{wt/Δ32}:** control positivo heterocigoto para $\Delta 32$; **CN:** control negativo. Los números 3 y 6 muestran dos fragmentos de 242 y 210 pb, indicando la presencia del polimorfismo $CCR5\Delta 32$ en heterocigosis.

Por otro lado, el tropismo viral tampoco mostró significativa con el sexo, edad o ruta de transmisión del VIH-1 en los pacientes analizados (tabla 4).

	Seroconvertores (n=67)			Naïve (n=52)			Pretratados (n=87)		
	R5	X4	p	R5	X4	p	R5	X4	p
Hombre (%)	89	78	0,30	81	75	0,47	80	87	0,02
Edad (años), media (DS)	31,7 (3,6)	34,2 (8)	0,44	40,1 (8,4)	38,3 (7,1)	0,58	42,5 (6,7)	41,2 (7,6)	0,44
Genotipo <i>CCR5</i> Δ32 (%)									
wt/wt	83	89	0,68	75	100	0,14	85	89	0,55
wt/ <i>CCR5</i> Δ32	17	11		25	0		15	11	
Ruta de transmisión (%)									
Parenteral	7	22	0,2	24	17	0,45	47	32	0,18
Sexual	93	78		76	83		53	68	

DS: desviación estándar
wt: *wild type* o genotipo salvaje

Tabla 4. Asociación entre el tropismo viral y diversas características epidemiológicas de los pacientes.

4.6. Asociación entre tropismo viral y parámetros clínicos

La presencia de variantes X4-trópicas en individuos recientemente infectados y sujetos naïve, no se asoció con la viremia plasmática. Sin embargo, sí se observó una relación entre el tropismo viral y la viremia plasmática en pacientes pretratados, observándose cargas virales más elevadas en pacientes portadores de variantes X4-trópicas que en pacientes portadores de variantes R5-trópicas (4,2 vs 3,5 log cop/mL, respectivamente; $p=0,02$). Por otro lado, no se observó asociación entre la presencia de variantes X4 y el número de linfocitos T CD4+, en ninguno de los grupos de pacientes (tabla 5).

	Seroconvertores (n=67)			Naïve (n=52)			Pretratados (n=87)		
	R5	X4	p	R5	X4	p	R5	X4	p
carga viral, log cop/mL	4,4* (0,74)	4,2 (0,89)	0,41	4,1 (0,81)	4,2 (0,81)	0,93	3,5 (0,9)	4,2 (0,7)	0,02
linfocitos T CD4+, células/μL	547,9 (246,4)	510,7 (275)	0,93	521,8 (342,9)	334 (201,3)	0,1	392,8 (236,9)	367,6 (231,6)	0,63

*Media (desviación estándar)

Tabla 5. Asociación entre tropismo viral y parámetros clínicos: carga viral y linfocitos T CD4+.

4.7. Asociación entre tropismo viral y presencia de mutaciones de resistencia a las distintas familias de antirretrovirales

El análisis de las mutaciones de resistencia a los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (ITIAN), inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (ITINAN) e inhibidores de la proteasa (IP), mostró una mediana de mutaciones de resistencia en individuos seroconvertores y sujetos naïve, como era de esperar, significativamente menor que en pacientes pretratados ($p < 0,001$). En este último grupo, la mediana de mutaciones de resistencia por familias de fármacos fue la siguiente: ITIAN 1 [4], ITINAN 1 [2] e IP 5 [7] (tabla 2).

Analizando la población en conjunto, las mutaciones de resistencia más prevalentes fueron: la T215YF (26,8%) y la M41L (25,8%) para los ITIAN; la K103N (16,7%) y la Y181C (11,1%) para los ITINAN y las mutaciones L10I/R/V/F (28,3%), A71V/T (27,8%) y L90M (23,2%) para los IP. En la figura 2 se muestra la prevalencia de mutaciones de resistencia por familias de fármacos antirretrovirales ITIAN, ITINAN e IP.

En seroconvertores recientes ($n=67$), se observaron mutaciones de resistencia a ITIAN (4,5%), ITINAN (6%) y a IP, (26,9%). Las mutaciones de resistencia más frecuentes fueron la D67N (3%) para los ITIAN, la K103N (16,7%) para los ITINAN y la A71V/T (19,4%) para los IP.

En el grupo de pacientes naïve, (n=52), se observaron mutaciones de resistencia a los ITIAN (7,7%), y a IP (17%). No se encontró ninguna mutación de resistencia a los ITINAN. La mutación M41L (8,5%) fue la única mutación de resistencia observada en la RT así como cambios en la posición 10 (L10I/R/V/F) de la PR (21,2%). El polimorfismo L63P, fue la mutación más común en pacientes seroconvertidores recientes (50,7%) y en pacientes naïve (61,7%).

En pacientes pretratados (n=87), el 86,2% de los pacientes, presentaban mutaciones de resistencia a ITIAN, un 57,5% a ITINAN y un 62,1% a IP. La mutación más prevalente para los ITIAN fue la T215YF (61,9%), seguida de la M41L (54,8%). Para los ITINAN, la K103N (34,5%) y para los IP, la mutación L90M (51,2%), cambios en la posición 10 de la PR L10I/R/V/F (48,8%) y la mutación A71V/T (47,6%) fueron las mutaciones más prevalentes.

Con el fin de analizar si el tipo de tratamiento antirretroviral influía en la emergencia de cepas X4-trópicas, se seleccionó dentro de los 87 pacientes pretratados incluidos en el estudio un subgrupo de 23 pacientes, que estaban fracasando a ITINAN y que nunca habían sido expuestos a IP y 15 pacientes fracasando a regímenes terapéuticos que contenían un IP y que nunca habían recibido ITINAN como parte de su tratamiento antirretroviral.

No se encontró ninguna asociación entre la presencia de variantes X4-trópicas y el número de mutaciones de resistencia en el gen *pol* (RT/PR) cuando se

analizó la población en conjunto. Del mismo modo, el análisis de la prevalencia de variantes X4-trópicas observada en pacientes que fracasaban a ITINAN y en pacientes que fracasaban a IP, no mostró ninguna asociación entre la presencia de variantes X4-trópicas y las mutaciones de resistencia en el gen *pol* en ambos grupos de pacientes (21,7% vs 33,3%, $p=0,43$, respectivamente).

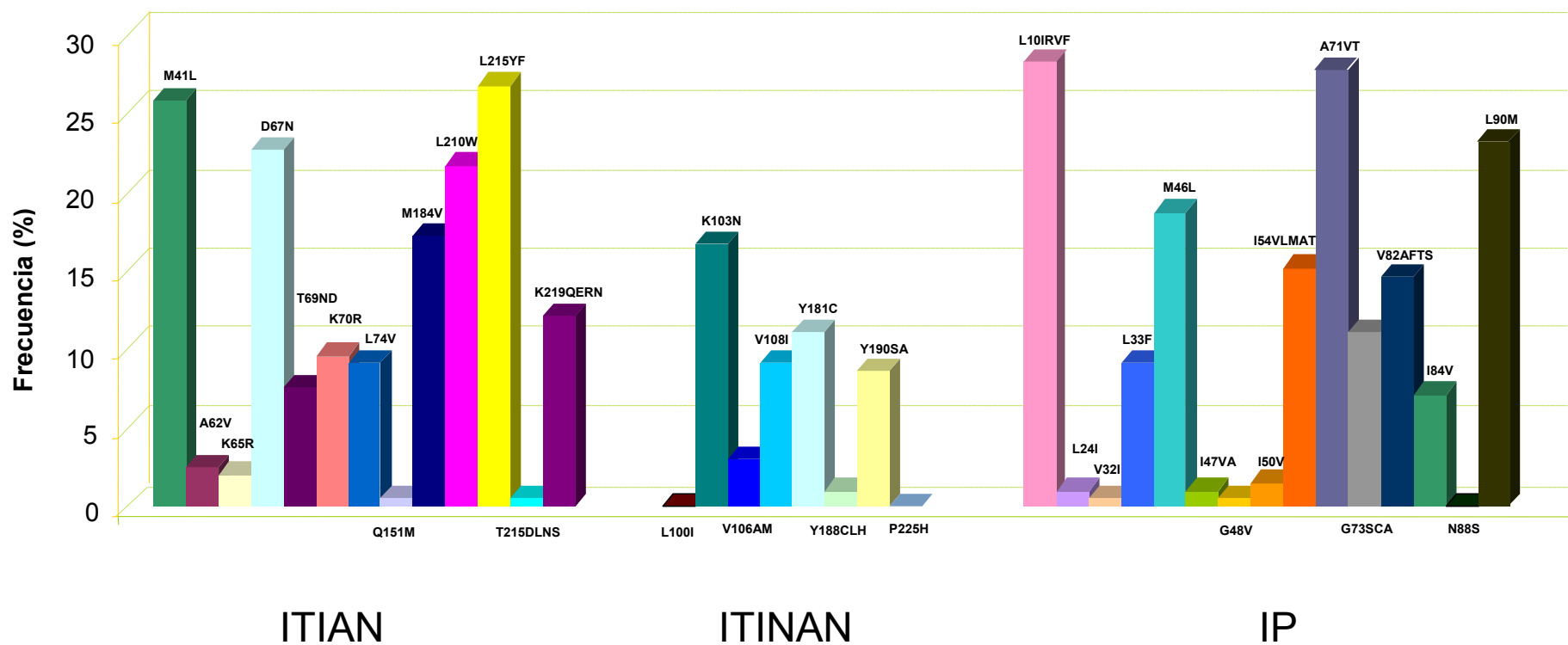


Figura 2. Prevalencia de mutaciones de resistencia a las familias de fármacos antirretrovirales ITIAN, ITINAN e IP.

4.8. Asociación entre tropismo viral y el nivel de interleuquina-7 en plasma

El nivel de IL-7 en plasma se realizó en un total de 62 pacientes: 30 pacientes naïve a tratamiento y 32 pacientes pretratados. En el resto de pacientes la determinación de IL-7 no pudo realizarse por falta de muestra. El análisis en conjunto de la población de estudio, mostró una asociación directa entre la viremia plasmática y el nivel de IL-7 en plasma ($r=0,335$, $p=0,009$), cuando se ajustó por el número de linfocitos T CD4+. En individuos naïve a tratamiento antirretroviral, el nivel de IL-7 en plasma se asoció inversamente con el número de linfocitos T CD4+, cuando se ajustó por la viremia plasmática, ($r=-0,47$, $p=0,014$). Sin embargo, cuando se examinó si existía asociación de la IL-7 con la viremia plasmática, cuando se ajustó por el número de CD4, se observó una tendencia, aunque no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($r=0,59$, $p=0,05$). Por otro lado, en pacientes pretratados, aunque el nivel de IL-7 en plasma se asoció directamente con la viremia plasmática, ajustando por el número de linfocitos T CD4+ ($r=0,37$, $p=0,026$), no se observó ninguna asociación con el número de linfocitos T CD4+ ($p=0,3$).

No se observó ninguna asociación entre el tropismo viral y el nivel de IL-7 en plasma, cuando se analizó la población en conjunto ($p=0,8$). Tampoco cuando se consideraron los grupos de pacientes naïve ($p=0,9$) y pretratados ($p=0,8$) de forma independiente.

III. Estudio 3: Impacto del tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) en el uso del correceptor en pacientes VIH+

4.9. Diseño del estudio

En total se seleccionaron para este estudio 73 pacientes con infección crónica por VIH-1: 42 pacientes pretratados y 31 individuos naïve a tratamiento con un número de linfocitos T CD4+ superior a 350 células/ μ L. Se realizó una búsqueda retrospectiva de la muestra basal de los 73 pacientes. En los 42 pacientes pretratados, se consideró la muestra basal, la muestra previa al inicio de TARGA. En el grupo de pacientes naïve, se consideró como muestra basal, la primera visita del paciente realizada en nuestro hospital. Dentro del grupo de pacientes pretratados, 21 de los 42 pacientes, habían tomado tratamiento antirretroviral en monoterapia o biterapia con zidovudina (AZT) y didanosina (ddI) antes de 1996.

El número de muestras seleccionadas en los 42 pacientes pretratados coincidieron con cada uno de los fracasos virológicos que presentó cada paciente. En individuos naïve (n=31), las muestras se seleccionaron cada 12 o 24 meses. Tanto en pacientes pretratados como en individuos naïve, se seleccionaron entre 3 y 6 muestras a lo largo de los 6 años del periodo de estudio, en función de la disponibilidad de muestra. En total se seleccionaron 253 muestras, 158 de pacientes pretratados y 95 de individuos naïve. En la figura 3 se presenta un esquema del diseño del estudio.

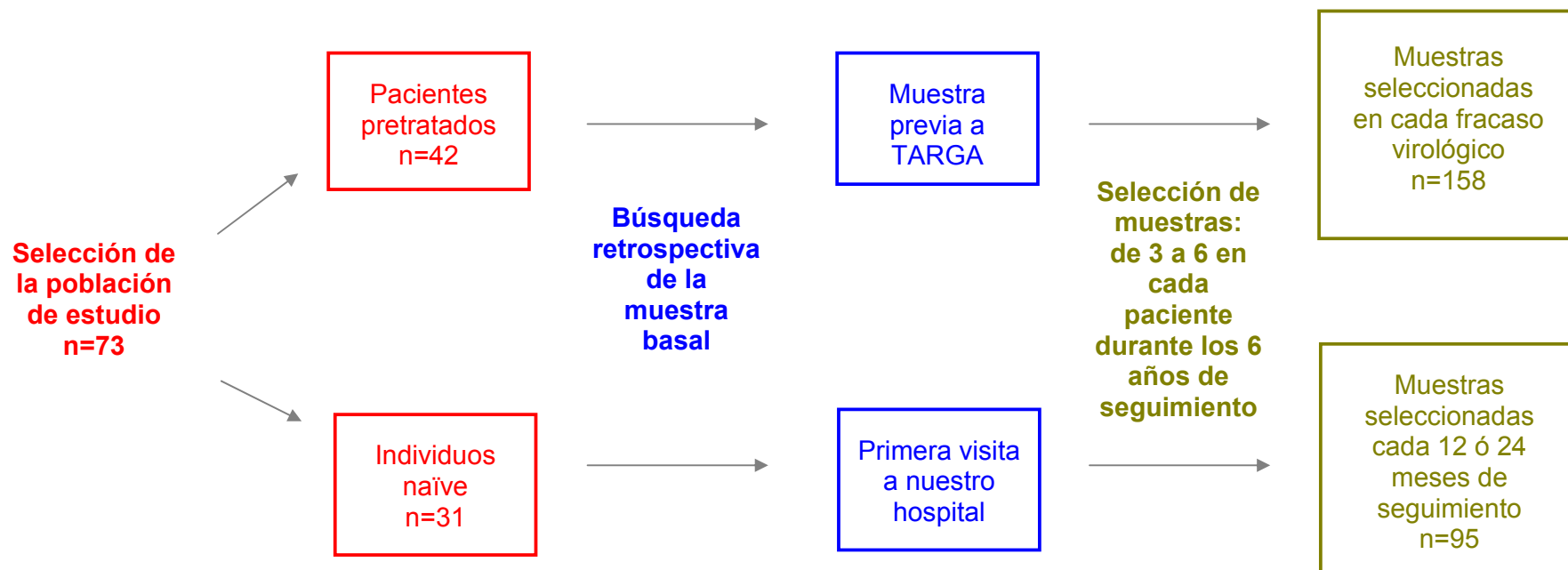


Figura 3. Esquema del diseño del estudio 3.

4.10. Población de estudio

La muestra basal para pacientes que continuarían sin tratamiento fue considerada la primera visita realizada en nuestro hospital y en los pacientes que iban a iniciar tratamiento se tomó la muestra previa al inicio de TARGA. Un 84% (n=173) de los pacientes fueron hombres. La media de edad en pacientes que iban a iniciar TARGA y en individuos que continuarían sin tratamiento fue similar en ambos grupos (44 vs 41 años; $p=0,079$).

En el momento basal, la media de carga viral fue menor en pacientes naïve que no iban a iniciar tratamiento, que en aquellos pacientes que iban a iniciar tratamiento ($p<0,0004$). Sin embargo, la media de linfocitos T CD4+ fue significativamente más elevada en el primer grupo, comparada con el último ($p<0,001$). El nadir de linfocitos T CD4+, en pacientes que iban a iniciar terapia, se consideró el número más bajo de células T CD4+ que alcanzó un individuo antes de iniciar terapia antirretroviral, mientras que en pacientes que continuaron sin tratamiento, el nadir de linfocitos T CD4+, se consideró la cifra más baja alcanzada en cualquier momento del seguimiento. Los pacientes que permanecieron sin tratamiento, mostraron un nadir más elevado que pacientes que iban a iniciar TARGA ($p=0,034$). Todos los pacientes incluidos en el estudio estaban infectados con variantes virales subtipo genético B. En la tabla 6 se presentan éstas y otras características basales de la población de estudio.

	Total (n=73)	Naïve (n=31)	Pacientes que inician TARGA (n=42)	p
Sexo masculino, n (%)	61 (84)	27 (81)	34 (81)	0,541
Ruta de transmisión, n (%)				
UDVP	27 (40)	11 (42)	16 (38)	0,828
Homosexuales	24 (35)	8 (31)	16 (38)	
Heterosexuales	17 (25)	7 (27)	10 (24)	
Edad, años*	42,5 (6,9)	41(8,5)	44 (5,3)	0,079
VIH-ARN, log cop/mL*	4,2 (0,9)	3,8 (0,9)	4,5 (0,9)	0,004
Linfocitos T CD4+, células/μL*	386 (229)	536 (191)	278 (192)	<0,001
Nadir linfocitos T CD4+, células/μL*	328,9 (180,9)	380,9 (174,9)	290,4 (177,7)	0,034
Año de infección*	1994,7 (6,2)	1997 (6)	1993 (5)	0,002
Niveles de IL-7 en plasma, UI/mL*	4,9 (4,3)	4 (4,5)	5,4 (4,2)	0,309
VIH-1 variantes CXCR4-trópicas, n (%)	7 (10)	1 (3)	6 (15)	0,227

* Media (desviación estándar)

UI: Unidades Internacionales; UDVP: Usuarios de Drogas por Vía Parenteral

Tabla 6. Características basales de la población de estudio

4.11. Prevalencia de cepas X4-trópicas en el momento basal

La determinación del uso del correceptor se llevó a cabo en 237 (94%) de las 253 muestras, procedentes de 73 pacientes incluidos en el estudio. En el resto de muestras (n=16), la determinación del tropismo viral no pudo realizarse por insuficiencia de muestra. 148 (62%) muestras pertenecían a pacientes que iban a iniciar tratamiento y 89 (38%) muestras, a pacientes que iban a continuar sin tratamiento. En el momento basal, la prevalencia global de variantes X4-trópicas fue del 10%. Aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas, cuando se analizó la proporción de variantes CXCR4-trópicas en el momento basal entre ambos grupos, se observó un aumento en el grupo de pacientes que iban a iniciar TARGA comparado con el grupo de pacientes que no iban a iniciar tratamiento (15% vs 3%; $p=0,112$) (tabla 6).

4.12. Factores asociados con el tropismo viral en el momento basal

En pacientes que inician tratamiento, no se observó ninguna asociación entre el tropismo viral y el sexo, ruta de transmisión, año de infección o la edad. Tampoco se observó ninguna asociación entre el tropismo viral y la presencia de la delección $\Delta 32$ en el gen *ccr5*, la viremia plasmática basal o el número de linfocitos T CD4+ en el momento basal (tabla 7).

En el grupo de pacientes que continuaron sin tratamiento, sólo uno de los 31 pacientes presentaba variantes virales X4-trópicas, por lo que no se pudo llevar a cabo el análisis estadístico en el momento basal.

El nivel de IL-7 en plasma en el momento basal fue cuantificado en 52 de 73 pacientes: en 15 individuos naïve que continuaron sin tratamiento y 37 pacientes crónicos que iban a iniciar TARGA. En el resto de pacientes no se pudo llevar a cabo la determinación de la concentración de IL-7 por falta de muestra. Aunque niveles elevados de IL-7 en plasma se asociaron con cargas virales elevadas, cuando se ajustó por el número de linfocitos T CD4+, sólo se observó una correlación positiva entre la carga viral y el nivel en plasma de IL-7 en pacientes que no iban a ser tratados ($r=0,6$, $p=0,018$). No se observó asociación entre el nivel de IL-7 basal y el tropismo viral en ninguno de los grupos de pacientes.

	Basal						Seguimiento					
	Naïve (n=31)			Pacientes que inician TARGA (n=42)			Naïve (n=31)			Paciente que inician TARGA (n=42)		
	R5 (n=30)	X4 (n=1)	p	R5 (n=36)	X4 (n=6)	p	Cambio R5 a X4 (n=6)	No cambio [†] (n=25)	p	Cambio R5 a X4 (n=9)	No cambio [†] (n=33)	p
VIH-RNA, log cop/mL*	3,8 (0,9)	--		4,6 (0,9)	4,2 (1,3)	0,390	3,5 (0,8)	3,9 (0,9)	0,44	4,8 (0,6)	4.4 (1,04)	0,220
Linfocitos T CD4+, céls/μL*	525,5 (190,1)	--		251,7 (172,6)	398,8 (247,8)	0,120	540,7 (179,7)	537,7 (198,6)	0,97	148,4 (198,6)	329.9 (166,4)	0,016
Nadir CD4+, céls/μL*	377,8 (177)	--		281,9 (180,5)	341,7 (164,9)	0,450	325,3 (177,2)	397,2 (174,6)	0,35	165,5 (143,5)	340.4 (166,7)	0,003
Nivel IL-7, UI/mL*	3,1 (3,2)	--		5,5 (4,4)	4,5 (3,6)	0,610	4,8 (6,4)	3,6 (3,7)	0,66	6,1 (4,5)	5.1 (4,2)	0,540
Año de infección*	1997,3 (6,4)	--	>0,9	1992,6 (5,5)	1991,8 (1,3)	0,480	1994,9 (5,6)	1998,2 (6,5)	0,23	1992,3 (4,5)		
Hombres, n (%)	26 (86,7)	1 (100)	>0,9	29 (80,6)	5 (83,3)	>0,90	6 (100)	21 (84)	0,56	8 (88,9)	26 (78,8)	0,660
Edad, años	40,6 (8,6)	--	--	43,3 (5,1)	46,2 (6,5)	0,220	44,1 (8)	39,7 (8,5)	0,24	43,4 (4,2)	43,8 (5,8)	0,820
Genotipo CCR5Δ32, n (%)												
wt/wt	22 (97,5)	1 (100)	>0,9	27 (93,1)	5 (83,3)	0,440	6 (100)	17 (94,4)	>0,9	7 (87,5)	22 (1,7)	0,550
wt/CCR5Δ32	1 (4,3)	--		2 (6,9)	1 (16,7)		--	1 (5,6)		1 (12,5)	2 (8,3)	
Ruta de transmisión, n (%)												
Parenteral	10 (40)	1 (100)	0,42	15 (41,7)	1 (16,7)	0,380	3 (42,9)	8 (42,1)	>0,9	5 (41,7)	11 (36,7)	>0,90
Sexual	15 (60)	--		21 (58,3)	5 (83,3)		4 (57,1)	11 (57,9)		7 (58,3)	19 (63,3)	

* Media (desviación estándar)

† Parámetros estudiados en el momento basal

UI: Unidades internacionales; wt: *wild type* o genotipo salvaje

Tabla 7. Asociación entre el tropismo viral y las características de la población de estudio en el momento basal y durante el seguimiento

4.13. Características del cambio en el uso del correceptor durante el seguimiento longitudinal

La frecuencia de cambio en el uso del correceptor a lo largo del seguimiento en toda la población de estudio (n=73), fue del 26% (n=19). Cuando se comparó la frecuencia de cambio en el uso del correceptor en pacientes que continuaron sin tratamiento (n=31) y pacientes que iniciaron terapia (n=42), se observaron datos similares (23% (n=7) vs 29% (n=12) respectivamente, p=0,564).

De los 19 pacientes en los que se observó cambio en el uso del correceptor, un 79% (n=15), independientemente de si estaban o no tomando tratamiento antirretroviral, experimentaron un cambio en el uso del correceptor de CCR5 a CXCR4.

Cuando se analizaron los grupos por separado, se observó que de los 7 sujetos naïve que experimentaron un cambio, un 86% (n=6) lo experimentaron de CCR5 a CXCR4. No se observó asociación en la cifra de linfocitos T CD4+ entre el momento basal y el momento del cambio ($439 \pm 50,9$ vs $307,8 \pm 164,1$ células/ μ L, p=0,273) en este grupo de pacientes.

De los 12 pacientes que iniciaron TARGA y que experimentaron cambio en el uso del correceptor, en un 75% (n=9) de ellos, el cambio ocurrió de CCR5 a CXCR4. Al igual que en pacientes naïve, no se asoció el número de linfocitos T CD4+ en el momento basal y en el momento del cambio ($88,5 \pm 91,7$ vs $172,8 \pm 109,6$ células/ μ L, p=0,174). Además, en 4 de los 12 pacientes que iniciaron

terapia, se observó una oscilación en cuanto al cambio en el uso del correceptor de CCR5 a CXCR4 y de nuevo a CCR5. Sin embargo, en el grupo de individuos naïve, no se observó ninguna oscilación en el cambio de tropismo.

4.14. Factores asociados con el cambio del uso del correceptor durante el seguimiento longitudinal

La media de tiempo de seguimiento en pacientes que iniciaron terapia y en individuos que continuaron sin tratamiento fue de 84,2 y 76,7 meses, respectivamente. Analizando la población en conjunto, la tasa de cambio de tropismo viral de CCR5 a CXCR4 y *viceversa*, durante los primeros 12 meses de seguimiento fue del 4,1%. Ningún paciente que continuó sin tratamiento sufrió cambio en el uso del correceptor tras el primer año de seguimiento, mientras que en 3 pacientes que iniciaron terapia, se observó un cambio en el uso del correceptor de CCR5 a CXCR4. Cuando el análisis se realizó tras 72 meses de seguimiento, la tasa de cambio de tropismo viral de CCR5 a CXCR4 y *viceversa*, fue del 22%. Analizando independientemente pacientes con y sin tratamiento, la tasa de cambio de CCR5 a CXCR4 y *viceversa*, fue similar en ambos grupos (26,2% vs 16,1% respectivamente, $p=0,481$). Del mismo modo, cuando el estudio se acotó a pacientes en los que se observó solamente cambio en el uso del correceptor de CCR5 a CXCR4, la tasa de cambio de tropismo viral tras 72 meses de seguimiento, fue similar en pacientes pretratados e individuos naïve (19% vs 13% respectivamente, $p=0,483$).

No se observó asociación entre el cambio en el uso del correceptor con el género, la edad, la ruta de transmisión o el año de infección. Tampoco se observó una asociación entre la presencia del polimorfismo *CCR5*Δ32 y el cambio de tropismo viral.

En pacientes naïve, se observaron valores de linfocitos T CD4 basales similares en pacientes que sufrieron cambio en el uso del correceptor de *CCR5* a *CXCR4*, y los que no sufrieron cambio ($540,7 \pm 179,7$ vs $537,7 \pm 198,6$ células/ μ L respectivamente $p=0,97$) y en el nadir de linfocitos T CD4+ ($325,3 \pm 177,2$ vs $397,2 \pm 174,6$ células/ μ L respectivamente, $p=0,35$).

Sin embargo, en pacientes que tomaban TARGA, el cambio en el uso del correceptor de *CCR5* a *CXCR4* se asoció con un menor número de linfocitos T CD4+ en el momento basal ($148,4 \pm 198,6$ vs $329,9 \pm 166,4$ células/ μ L, $p=0,016$), así como con un nadir de células T CD4+ inferior ($165,5 \pm 143,5$ vs $340,4 \pm 166,7$ células/ μ L, $p=0,003$).

Cuando se evaluó a lo largo del seguimiento la relación entre el nivel de IL-7 en plasma y la viremia plasmática, independientemente de si los pacientes tomaban o no TARGA, no se observó ninguna asociación. Finalmente, el nivel de IL-7 en plasma tampoco se asoció con el cambio en el uso del correceptor ni en pacientes que iniciaron TARGA ni en individuos naïve.

IV. Estudio 4: Influencia del tratamiento antirretroviral de gran actividad en la expresión del correceptor CCR5

4.15. Población de estudio

En este estudio, se incluyeron 26 pacientes con infección crónica por VIH-1 que iniciaron TARGA y mantuvieron carga viral indetectable (<50 copias/mm³) durante dos años de seguimiento. De los 26 pacientes, un 81% (n=21) fueron hombres y todos los pacientes incluidos en el estudio estaban infectados con variantes virales del subtipo genético B. La mediana de edad de los pacientes del estudio fue 43 [9] años y en el momento basal (antes de iniciar TARGA), la mediana de carga viral fue 4,70 [0,66] log copias/mL y la de linfocitos T CD4+ fue 308 [248] células/ μ L. Como grupo control se seleccionaron 11 individuos VIH negativos.

4.16. Perfil de expresión de la molécula CCR5 en linfocitos T CD4+ y CD8+

En la figura 4, se muestra un ejemplo ilustrativo del análisis de expresión de la molécula de CCR5 en linfocitos T CD4+ y T CD8+ totales en un paciente del estudio. El análisis de la expresión de la molécula de CCR5 tanto en nivel (% de células CCR5+) como en densidad (nº moléculas de CCR5/célula en la población celular CCR5+) en linfocitos T CD4+ y T CD8+ totales de pacientes VIH positivos, mostró tanto para niveles como para densidad, valores significativamente más elevados en linfocitos T CD8+ que en linfocitos T CD4+ ($p<0,001$). Cuando se analizaron las células con fenotipo naïve (CD45RO-) y memoria (CD45RO+), se observaron niveles de CCR5 más elevados en células

con fenotipo memoria que en células con fenotipo naïve tanto en linfocitos T CD4+ como en linfocitos T CD8+ ($p<0,001$). Resultados similares se observaron cuando se comparó la densidad de expresión de la molécula CCR5 en la población total de linfocitos T CD4+ o CD8+ y en sus subpoblaciones con fenotipo naïve o memoria, en pacientes VIH positivos (tabla 8).

Individuos sanos, también mostraron un mayor nivel y densidad de expresión de CCR5, en linfocitos T CD8+ que en T CD4+ totales y en sus subpoblaciones naïve y memoria (tabla 8).

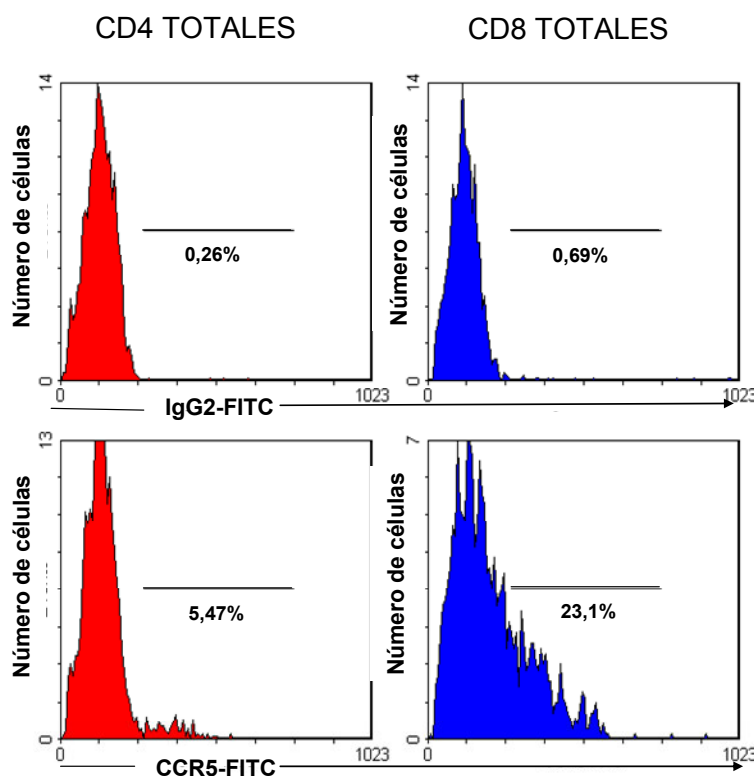


Figura 4. Ejemplo ilustrativo en el que se compara la expresión de la molécula CCR5 en linfocitos T CD4+ y T CD8+, tanto en el control isotópico (IgG2) como en la molécula CCR5.

Nivel de expresión del correceptor CCR5 (porcentaje de células CCR5+)				Densidad de expresión del correceptor CCR5 (moléculas/célula en las células CCR5+)		
Pacientes VIH+	Linfocitos T CD4+	Linfocitos T CD8+	p	Linfocitos T CD4+	Linfocitos T CD8+	p
población total	6,9 (6,5)*	14,6 (27,23)	<0,001	3285 (1288)	4814 (5364)	<0,001
CD45RO-	1,45 (5,44)	10,7 (19,58)	<0,001	2299 (1939)	4122 (4014)	0,007
CD45RO+	10,6 (11,1)	22,9 (37,8)	<0,001	3150 (1608)	4727 (2166)	<0,001
Individuos sanos						
población total	6,87 (6,5)	19,96 (18,58)	0,004	1970 (873)	4165 (2275)	0,003
CD45RO-	1,32 (1,16)	6,7 (28,38)	0,006	1987 (743)	4156 (4073)	0,008
CD45RO+	13,9 (12,21)	51 (28,38)	0,003	2259 (1228)	3669 (2500)	0,003

*Mediana (amplitud intercuartílica)

Tabla 8. Perfil de expresión de la molécula CCR5, como nivel y como densidad, en linfocitos T CD4+ y T CD8+ en pacientes VIH-1 antes de iniciar terapia y en individuos sanos.

4.17. Influencia de la infección por VIH-1 en la expresión de CCR5

El nivel de expresión de CCR5 en la población total, así como en la subpoblación con fenotipo naïve de linfocitos T CD4+ y CD8+, fue similar en pacientes VIH positivos y en individuos sanos ($p>0,05$) (tabla 9). Sin embargo, el nivel de expresión de CCR5 en linfocitos T CD8+ con fenotipo memoria, fue significativamente más bajo en pacientes infectados que en controles sanos (22,9% [37,8] vs 51% [28,4], $p=0,03$).

La densidad de expresión de la molécula CCR5 en linfocitos T CD4+, mostró valores significativamente mayores en pacientes VIH+ que en individuos sanos, tanto en la población total (CD4+: 3285 [1288] vs 1970 [873] moléculas/célula; $P=0,001$), como en las subpoblaciones con fenotipo naïve (CD4+CD45RO-: 2999 [1939] vs 1987 [743] moléculas/célula, $p=0,006$) y memoria (CD4+CD45RO+: 3150 [1608] vs 2259 [1228] moléculas/célula, $p=0,012$). El análisis llevado a cabo en linfocitos T CD8+ mostró valores similares de densidad de CCR5 tanto en pacientes infectados como no infectados en la población total y en las subpoblaciones con fenotipo naïve (CD8+CD45RO-). Sin embargo, en linfocitos T CD8+ con fenotipo memoria (CD8+CD45RO+) se observó una tendencia a un número de moléculas de CCR5 más elevada en pacientes infectados que en individuos sanos (4727 [2166] vs 3669 [2500] moléculas/célula, respectivamente, $p=0,040$) (tabla 9).

Nivel de expresión del correceptor CCR5 (porcentaje de células CCR5+)				Densidad de expresión del correceptor CCR5 (moléculas/célula en las células CCR5+)		
Linfocitos T CD4+	Individuos sanos	Pacientes VIH+	p	Individuos sanos	Pacientes VIH+	p
población total	6,87 (4,4)*	6,9 (6,5)	0,690	1970 (873)	3285 (1288)	0,001
CD45RO-	1,32 (1,16)	1,45 (5,4)	0,700	1987 (743)	2999 (1939)	0,006
CD45RO+	13,99 (12,21)	10,6 (11,1)	0,225	2259 (1228)	3150 (1608)	0,012
Linfocitos T CD8+						
población total	19,96 (18,58)	14,6 (27,23)	0,618	4165 (2275)	4814 (5364)	0,181
CD45RO-	6,71 (11,74)	10,68 (19,58)	0,303	4156 (4073)	4122 (4014)	0,566
CD45RO+	51 (28,4)	22,9 (37,8)	0,030	3669 (2500)	4727 (2166)	0,040

*Mediana (amplitud intercuartílica)

Tabla 9. Perfil de expresión de la molécula CCR5, como nivel y como densidad, en pacientes VIH positivos en el momento basal del seguimiento y en individuos sanos.

4.18. Influencia de la terapia antirretroviral en la expresión de CCR5

Cuando se analizó si TARGA tenía algún efecto en la expresión de la molécula CCR5, se observó un nivel de expresión en pacientes VIH positivos similar en el momento basal y tras 24 meses de tratamiento antirretroviral, en linfocitos T CD4+ totales y en las subpoblaciones con fenotipo naïve y memoria. El análisis en linfocitos T CD8+, también mostró datos similares en el momento basal y tras el tratamiento tanto en la población total como en la subpoblaciones con fenotipo naïve (CD8+CD45RO-) y memoria (CD8+CD45RO+) (tabla 10).

Del mismo modo, la densidad de expresión de CCR5 en linfocitos T CD4+ totales y en las subpoblaciones con fenotipo naïve y memoria, permaneció similar en el momento basal y tras 24 meses de terapia antirretroviral exitosa (tabla 10), permaneciendo más elevada en pacientes VIH+ que en individuos sanos tras 2 años de seguimiento.

	Nivel de expresión del correceptor CCR5 (porcentaje de células CCR5+)				Densidad de expresión del correceptor CCR5 (moléculas/célula en las células CCR5+)			
	Basal	Mes 12	Mes 24	p	Basal	Mes 12	Mes 24	p
Linfocitos T CD4+ (n=18)								
población total	6,9 (5,5)*	6,2 (4,9)	6 (6,43)	0,23	3285 (1235)	3196 (2592)	3702 (1271)	0,29
CD45RO-	1,45 (4,43)	1,37 (1,68)	1,5 (2,18)	0,69	2922 (1449)	4557 (4016)	4419 (4120)	0,23
CD45RO+	11,5 (6,71)	13 (12,97)	10,3 (10,11)	0,93	3150 (1430)	3722 (2430)	3315 (1331)	0,79
Linfocitos T CD8+ (n=18)								
población total	17,95 (29,49)	17,25 (21)	15,16 (27,2)	0,41	4677 (5086)	4188 (3413)	4175 (1521)	>0,99
CD45RO-	10,48 (23,28)	11,37 (18,53)	10,93 (21,53)	0,93	3871 (5312)	4965 (3341)	3907 (2149)	0,93
CD45RO+	22,9 (37,8)	40,4 (33,8)	38 (45)	0,61	4727 (1969)	5222 (2349)	4827 (1387)	0,79

*Mediana (amplitud intercuartílica)

Tabla 10. Nivel de expresión de CCR5 en pacientes VIH positivos en el momento basal y durante la terapia TARGA.

4.19. Nivel de activación en linfocitos T CD4+ y CD8+ y evolución bajo TARGA

El nivel de activación medido con el marcador CD38, antes de iniciar TARGA, mostró valores significativamente más elevados en pacientes VIH positivos (n=26) que en controles sanos (n=11), tanto en linfocitos T CD4+ totales (4201 [2220] vs 3126 [1046] moléculas/célula, $p=0,024$) como en linfocitos T CD8+ totales (5130 [3856] vs 1206 [742] moléculas/célula, $p<0,0001$).

Como era de esperar, los niveles de expresión del marcador CD38 disminuyeron significativamente desde el momento basal, es decir, antes de iniciar TARGA, hasta después de 12 y 24 meses de tratamiento tanto en linfocitos T CD4+ totales ($p=0,021$), como en linfocitos T CD8+ totales ($p=0,005$) (tabla 11).

Pacientes VIH+	Basal	Mes 12	Mes 24	p
CD4+	4201 (2220)*	3839 (1756)	3286 (967)	0,021
CD8+	4395 (3687)	1795 (1536)	1399 (894)	0,005

*Mediana (amplitud intercuartílica)

Tabla 11. Nivel de activación del marcador CD38 en linfocitos T CD4+ y CD8+ totales en individuos VIH+ durante la terapia con TARGA

A nivel basal, la expresión del marcador CD38 en la población de linfocitos T CD8+, se correlacionó positivamente con la carga viral ($Rho=0,493$, $p=0,012$), mientras que la expresión de este marcador en células T CD4+ se correlacionó de forma inversa con el conteo de células T CD4 ($Rho= -0.437$, $p=0,033$). El nivel de expresión de la molécula de CCR5, no mostró asociación significativa, tanto en porcentaje como en densidad, con la carga viral, el conteo de linfocitos T CD4 o el nivel de activación inmune en linfocitos T CD4 y T CD8+.

DISCUSIÓN

El proceso de entrada del VIH en la célula requiere de la interacción de la glicoproteína de la envuelta viral gp120 con el receptor celular CD4 (Dalglish *et al.* 1984, Klatzmann *et al.* 1984, Sattentau *et al.* 1988) y con uno de los receptores de quimiocinas, CCR5 y/o CXCR4 (Alkhatib *et al.* 1996, Deng *et al.* 1996, Feng *et al.* 1996). El tropismo del VIH por los receptores de quimiocinas clasifica las variantes virales como R5-trópicas, X4-trópicas o duales, en función del uso del correceptor (Berger *et al.* 1998). Las variantes R5-trópicas predominan en etapas iniciales de la infección, mientras que las cepas X4-trópicas emergen en etapas más avanzadas de la enfermedad y su aparición se ha asociado con un descenso en la cifra de linfocitos T CD4+ y con una rápida progresión a SIDA (van't Wout *et al.* 1994, Connor *et al.* 1997, Schuitemaker *et al.* 1992, Pope *et al.* 2003, Philpott *et al.* 2006, Daar *et al.* 2007, Koot *et al.* 1993). La evolución del tropismo viral durante la infección por VIH, su relación con la patogénesis y la progresión de la enfermedad son aspectos todavía no bien comprendidos.

El interés por los estudios de tropismo del VIH, ha aumentado desde que se iniciaron los ensayos clínicos con los antagonistas de los receptores CCR5 y CXCR4. Estas nuevas moléculas impiden la entrada del VIH en la célula inhibiendo la interacción entre la glicoproteína de envuelta viral gp120 y los receptores de quimiocinas CCR5 o CXCR4. Hasta el momento, el antagonista de CCR5 maraviroc (MVC, Celsentri® Pfizer), que inhibe específicamente la replicación de variantes R5-trópicas, es el único fármaco de esta familia

aprobado para el tratamiento de la infección por VIH. El mecanismo de acción de MVC difiere del resto de fármacos antirretrovirales desarrollados hasta el momento. La unión de MVC a la cavidad transmembrana formada entre las hélices 2, 3, 6 y 7 (Dorr *et al.* 2005, Castonguay *et al.* 2003) de CCR5, provoca cambios conformacionales, especialmente en la región ECL2 de CCR5, impidiendo la interacción entre dicha región y la corona de la región V3 de la glicoproteína gp120 del VIH-1. De este modo se inhibe la fusión entre la membrana viral y celular.

Datos obtenidos en los ensayos clínicos MOTIVATE, llevados a cabo en pacientes VIH+ que fracasaban a tratamiento antirretroviral, mostraron una mayor prevalencia de cambio de tropismo de R5 a dual/mixto, en pacientes que tomaban MVC, que en el grupo placebo (64% vs 5%) (Nelson *et al.* 2007). Estudios de clonaje posteriores en pacientes que fracasaron a MVC han sugerido la existencia de variantes X4 en el momento basal, aunque en concentraciones inferiores al límite de detección por el ensayo fenotípico utilizado para la determinación del tropismo viral (Westby *et al.* 2006), de manera que la emergencia de variantes X4 preexistentes, más que el cambio en el uso del correceptor, sería responsable de la resistencia a MVC en la mayoría de casos *in vivo*.

Debido al mecanismo de acción de estos compuestos, así como a la asociación observada entre la emergencia de variantes X4-trópicas y el fracaso con MVC,

el desarrollo y uso clínico de estos fármacos requiere de la determinación del uso del correceptor antes y durante el tratamiento con dichos fármacos, si hay fracaso virológico.

El único método validado hasta el momento para la determinación del tropismo viral en muestras clínicas es el ensayo fenotípico *Trofile*[®] (Monogram, Biosciences, USA) (Huang *et al.* 2001), basado en el uso de virus recombinantes. Sin embargo, los métodos fenotípicos son sofisticados, caros, requieren de infraestructuras especiales no disponibles en todos los laboratorios de VIH, así como de personal altamente cualificado. La disponibilidad de estudios genotípicos basados en la determinación de la secuencia de la región V3 de gp120, para la estimación del uso del correceptor, pueden ser una alternativa atractiva. Estos métodos son fiables, rápidos y accesibles a casi todos los laboratorios de VIH. Su uso facilitaría la incorporación de los antagonistas de los correceptores en el tratamiento de los pacientes VIH positivos.

Estudios previos han mostrado un elevado grado de exactitud en la estimación del tropismo viral utilizando predictores genotípicos, en secuencias de V3 derivadas de clones (Jensen *et al.* 2003, Resch *et al.* 2001, Sing *et al.* 2005). Sin embargo, es motivo de discusión si dichas técnicas son idóneas para su aplicación en la práctica clínica. Conocer la concordancia, la sensibilidad y la

especificidad que presentan las herramientas genotípicas es fundamental, para poder incorporarlas en la práctica clínica.

Los resultados de concordancia obtenidos en esta tesis cuando se compararon las herramientas genotípicas *PSSM_{X4R5}*, *geno2pheno* y *wetcat_{SVM}*, para la determinación del uso del correceptor con el ensayo fenotípico *Phenoscript*[®] (Eurofins, Viralliance Inc), fueron elevados, del 85,9%, 71,8% y 70,5%, respectivamente, para muestras clínicas con subtipo B. Con los tres predictores, se observó una alta sensibilidad, próxima al 90%, en *wetcat_{SVM}* y *geno2pheno* y del 80% en *PSSM_{X4R5}*. Sin embargo, la especificidad observada en *wetcat_{SVM}* y *geno2pheno*, fue relativamente baja, entre 65% y 68%, mientras que la obtenida con *PSSM_{X4R5}* fue bastante elevada, próxima al 90%. A la vista de los resultados obtenidos, *PSSM_{X4R5}*, parece ser el método más fiable para la determinación de variantes minoritarias X4-trópicas. Datos de concordancia similares se han observado en un estudio realizado en 74 pacientes naïve, en el que se compararon los predictores fenotípicos *Trofile*[®] (Monogram Biosciences) y *Phenoscrit*[®] (Eurofins, Viralliance Inc) con el predictor genotípico *geno2pheno*, resultando en un 86,5% y en un 79,7%, respectivamente. La sensibilidad obtenida, para la determinación de variantes X4-trópicas en este estudio fue ligeramente inferior a la observada en el nuestro, siendo de un 67% y 55%, respectivamente cuando se compararon *Trofile*[®] y *Phenoscript*[®] con *geno2pheno*. Por el contrario, la especificidad observada fue superior a la observada en nuestro estudio, prácticamente del

100% cuando se compararon ambos predictores fenotípicos con geno2pheno (Skrabal *et al.* 2007).

Existen datos controvertidos en cuanto a la sensibilidad y especificidad que presentan las técnicas genotípicas para la determinación de variantes virales minoritarias. Low *et al.* evaluaron el valor predictivo de diferentes algoritmos genotípicos para determinar el tropismo viral en 977 muestras de pacientes VIH+ naïve en comparación con los datos obtenidos utilizando el ensayo fenotípico *Trofile*[®]. Aunque los algoritmos utilizados demostraron una alta especificidad (88-97%), la sensibilidad para detectar variantes X4 fue inferior a la obtenida en nuestro estudio (22-45%) (Low *et al.* 2007). Estudios realizados en muestras clínicas de poblaciones diferentes (seroconvertores, naïve, pretratados y subtipos no-B), han mostrado datos de sensibilidad similares a los obtenidos en nuestro estudio para la detección de variantes X4 empleando algunas herramientas genotípicas específicas (Garrido *et al.* 2008, de Mendoza *et al.* 2008).

La discordancia observada en nuestro estudio entre métodos fenotípicos y genotípicos no pudo ser explicada mediante diferencias en la viremia plasmática, el número de linfocitos T CD4+ o el régimen terapéutico que recibían los pacientes. Hay que señalar que aunque la región V3 de la envuelta viral es el principal determinante del uso del correceptor (Hwang *et al.* 1991), otras regiones de la envuelta podrían influir en el tropismo viral (Hwang *et al.*

1991, Andeweng *et al.* 1993, Boyd *et al.* 199, Groenink *et al.* 1993, Hoffman *et al.* 2002). La exclusión de dichas regiones podría afectar a la estimación del uso del correceptor utilizando pruebas genotípicas. Los métodos genotípicos se basan exclusivamente en secuencias de la región V3 de gp120, mientras que la mayoría de los ensayos fenotípicos, como *Phenoscript*[®] (Labernardiere *et al.* 2004) y *Trofile*[®] (Huang *et al.* 2001), incluyen otras regiones de la envuelta. De este modo, podrían ser métodos más exactos para evaluar el tropismo viral. Por otro lado, la sensibilidad para la detección de variantes minoritarias X4-trópicas utilizando PCR, oscila entre un 10 y un 25%, siendo inferior a la sensibilidad que presentan los ensayos fenotípicos, lo que también podría explicar las diferencias de resultados entre métodos fenotípicos y genotípicos.

Hay que destacar que también se han observado diferencias en la determinación del tropismo viral utilizando diversos métodos fenotípicos. La comparación entre *Trofile*[®] y *Phenoscript*[®] mostró una concordancia del 85%. El 15% de discrepancia no pudo explicarse por diferencias entre los niveles de viremia o de linfocitos T CD4+. La discordancia podría deberse los distintos tamaños de los RNAs amplificados, al tipo de células usadas para expresar los correceptores y/o a los diferentes genes indicadores utilizados por los diferentes métodos fenotípicos (Skrabal *et al.* 2007).

Se han observado discrepancias entre las tres herramientas genotípicas utilizadas, que podrían ser debidas a diversos factores. En primer lugar, las

diferencias existentes en el número de secuencias pareadas genotipo-fenotipo, utilizadas para la validación de las herramientas informáticas *wetcat-SVM*, *geno2pheno* y *PSSM_{X4R5}*, podrían influir en la determinación del tropismo. La validación en el predictor *wetcat* se llevó a cabo con 271 secuencias pareadas (Pillai *et al.* 2003), *geno2pheno* se validó con 1100 secuencias pareadas (Sing *et al.* 2004) y, por último, la matriz X4-R5 de *PSSM* se validó utilizando 213 secuencias pareadas (Jensen *et al.* 2003). Por último, detalles técnicos de los predictores virtuales, como los distintos modelos estadísticos usados para llevar a cabo las predicciones, también podrían contribuir a las diferencias observadas. Mientras *wetcat-SVM* y *geno2pheno* emplean *support vector machine*, herramienta estadística que clasifica las secuencias de un modo binario, es decir, como secuencias R5 o X4, incluyendo las secuencias R5/X4 como secuencias X4 (Pillai *et al.* 2003, Sing *et al.* 2004), *PSSM_{X4R5}* interpreta la tendencia a utilizar CXCR4 como baja, intermedia o alta para virus R5, R5/X4 y X4, respectivamente (Jensen *et al.* 2003). Por ello, *PSSM_{X4R5}* presenta una especificidad más elevada para la detección de variantes X4-trópicas que las otras dos herramientas bioinformáticas.

El conocimiento de la prevalencia de variantes X4 en nuestra población de pacientes infectados por VIH podría facilitar conocer la proporción de pacientes que podrían beneficiarse de un tratamiento con antagonistas de CCR5. La elevada prevalencia de variantes X4-trópicas observada en pacientes con infección crónica multitratados que se encontraban en fracaso virológico

(34,5%), así como la observada en individuos VIH-1 naïve para tratamiento (15,4%) y en sujetos seroconvertidores recientes (9%), concuerda con los datos de otros estudios transversales. En estos trabajos se ha observado una prevalencia de variantes X4 del 22-50% en pacientes pretratados y del 12-20% en individuos naïve y seroconvertidores (Brumme *et al.* 2005, Demarest *et al.* 2004, Melby *et al.* 2006, Wilkin *et al.* 2006, Hunt *et al.* 2006, De Mendoza *et al.* 2007).

Los ensayos MERIT (Saag *et al.* 2007) evaluaron la eficacia de MVC vs EFV en pacientes naïve. No han podido demostrar la no inferioridad de MVC vs EFV, de manera que MVC sólo ha sido aprobado para pacientes pretratados. Según los datos obtenidos en nuestra población, más de la mitad de los pacientes pretratados podrían beneficiarse del tratamiento con antagonistas de CCR5.

Los datos obtenidos en nuestro estudio sobre la prevalencia de variantes X4 en distintos grupos de pacientes, concuerdan con la hipótesis de que las variantes R5-trópicas son las responsables de la transmisión y establecimiento inicial de la enfermedad, mientras que a medida que avanza la enfermedad emergen las variantes X4-trópicas (Moore *et al.* 2004, Margolis *et al.* 2006). El elevado nivel de expresión del correceptor CCR5 en las células de la mucosa genital (Kawamura *et al.* 2005), así como la elevada expresión de CCR5 y no de CXCR4 en las células epiteliales del intestino (Bomsel *et al.* 2002), podrían favorecer la transmisión de variantes R5-trópicas por vía sexual. Sin embargo,

tras la exposición al VIH-1 por vía parenteral, como sucede en individuos hemofílicos o usuarios de drogas por vía parenteral, el tamaño del inóculo es mayor y las células diana difieren de las presentes por vía sexual. Esto permitiría a las variantes X4 establecer la infección más fácilmente. En un estudio llevado a cabo en 203 seroconvertidores recientes, se observó una tendencia a una mayor prevalencia de variantes X4 en individuos que adquirieron la infección por vía parenteral comparada con la observada en individuos infectados mediante contactos sexuales (35,7% vs 16,5%, respectivamente, $p=0,07$) (de Mendoza *et al.* 2007).

Individuos que presentan la delección de 32 pares de bases en el gen *ccr5* (*CCR5* Δ 32) en heterocigosis, tienen sólo un alelo *CCR5* funcional y presentan niveles de expresión del correceptor CCR5 inferiores a los sujetos que no presentan el polimorfismo (Wu *et al.* 1997). Por tanto, si la disponibilidad de la molécula de CCR5 en la superficie celular disminuye, cabría esperar una relativa resistencia a la infección por VIH en pacientes portadores del polimorfismo en homocigosis o heterocigosis (de Roda Husman *et al.* 1999). En un estudio realizado en 55 individuos VIH+ y en 30 individuos sanos, la comparación entre el genotipo del gen *ccr5* y la expresión de la molécula CCR5 en células T CD4+, concluyó que individuos portadores de la delección, tanto en homocigosis como en heterocigosis, presentaban una expresión de CCR5 en células T CD4+, significativamente menor que en individuos homocigotos que no presentaban el polimorfismo (de Roda Husman *et al.* 1999).

La presencia del polimorfismo *CCR5*Δ32 podría tener un efecto negativo y aumentar la prevalencia de variantes X4 en individuos portadores de la delección (D'Aquila *et al.* 1998). En un estudio realizado en 979 pacientes naïve se observó que pacientes que presentaban el polimorfismo *CCR5*Δ32 en heterocigosis tenían casi el doble de posibilidades de tener variantes X4 que sujetos que no presentaban la delección (Brumme *et al.* 2005). Sin embargo, otro estudio llevado a cabo en 258 pacientes no mostró diferencias al comparar pacientes VIH-1 heterocigotos para la delección y homocigotos con genotipo salvaje (de Roda Husman *et al.* 1997). Los datos obtenidos en esta tesis no apoyan ninguna de estas dos hipótesis. De todos modos, la falta de asociación entre la presencia del polimorfismo *CCR5*Δ32 y el tropismo viral, o entre el polimorfismo *CCR5*Δ32 y el nivel de expresión de *CCR5* podría explicarse por el bajo número de pacientes que presentaron el polimorfismo.

La interleuquina 7 (IL-7) es una de las principales citoquinas que regula la homeostasis de las células T induciendo la timopoiesis (Grabstein *et al.* 1990, Plum *et al.* 1996, Hofmeister *et al.* 1999, Fry *et al.* 2001, Tan *et al.* 2001) y estimulando la proliferación y función citotóxica de las células T maduras (Chazen *et al.* 1989, Hickman *et al.* 1990). Diversos estudios han demostrado que el nivel de IL-7 en plasma es mayor en sujetos infectados por VIH que en individuos seronegativos y se correlaciona inversamente con el número de linfocitos T CD4⁺ (Napolitano *et al.* 2001, Mastroianni *et al.* 2001, Llano *et al.*

2001, Darcissac *et al.* 2001). Además, se ha observado que pacientes pretratados que fracasan a la terapia antirretroviral presentan elevadas concentraciones de IL-7 en plasma (Mastroianni *et al.* 2001). Todos estos estudios sugieren que la IL-7 está implicada en la homeostasis de las células T periféricas en pacientes con linfopenia. Los resultados obtenidos en esta tesis apoyan esta hipótesis; en pacientes naïve, elevados niveles de IL-7 se relacionaron con un bajo número de linfocitos T CD4+.

Por otra parte, la IL-7 podría tener un efecto perjudicial, induciendo la expresión del correceptor CXCR4 en células T CD4+ memoria, provocando una mayor susceptibilidad de dichas células a la infección y favoreciendo la emergencia de virus X4-trópicos (Jourdan *et al.* 2000). Sin embargo, en nuestro estudio no se observaron diferencias en los niveles de IL-7 en plasma cuando se compararon pacientes infectados con variantes X4 o R5-trópicas, tal como se ha observado en un estudio reciente (Lin *et al.* 2005).

Una mayor selección y acumulación de mutaciones de resistencia en el genoma del VIH-1 a otras familias de fármacos antirretrovirales (ITIAN, ITINAN e IP), podría influir en la selección de mutaciones de resistencia en el gen de la envuelta, y en particular en la región V3 de gp120, donde se une el correceptor, provocando modificaciones estructurales virales que impidiesen la unión de la glicoproteína gp120 del VIH, en particular de la región V3, al correceptor CCR5. Esto podría facilitar un cambio en el uso del correceptor. La elevada

variabilidad observada en la región V3 en nuestros pacientes seroconvertidores comparada con pacientes naïve y pretratados impidió que pudiéramos comprobar esta hipótesis. Por tanto, no podemos conocer si las mutaciones de resistencia en el gen *pol*, influyen en la aparición de mutaciones secundarias asociadas a V3, que modularían la unión a CCR5 basada en impedimentos estructurales.

Cuando se evaluó el porcentaje de variantes X4-trópicas que presentaban los distintos grupos de pacientes, se observó que los pacientes pretratados tenían una mayor proporción de variantes X4-trópicas. La falta de asociación observada entre la presencia de mutaciones de resistencia a las distintas familias de fármacos (ITIAN, ITINAN e IP), y la presencia de variantes X4, podría estar influida por el hecho de que la población de estudio presentó un número de mutaciones muy similar, lo que podría dificultar la detección de diferencias entre los distintos pacientes. Por otro lado, las mutaciones de resistencia se determinaron a partir del plasma, analizándose la secuencia consenso de diversas cuasiespecies, y no a través de estudios de clonaje, por lo que no podemos afirmar si las mutaciones observadas coexistirían en el mismo o en distintos genomas.

Los resultados obtenidos en el grupo de pacientes que fracasaban a IP y nunca habían tomado ITIAN y en pacientes que fracasaban a ITIAN y nunca habían recibido IP, no mostró diferencias en cuanto a la emergencia de variantes X4

en función del tratamiento recibido. Sin embargo, el reducido número de pacientes analizados en este estudio, podría influir en los resultados obtenidos. En este sentido, algunos estudios previos han mostrado que el uso de HAART podría retrasar la selección de variantes X4-trópicas. En un estudio llevado a cabo en 32 pacientes, 24 de los cuales presentaron variantes R5-trópicas de forma exclusiva antes del inicio de la terapia antirretroviral, y 8 presentaron cepas dual-mixtas, no se observó cambio en el tropismo viral en pacientes que presentaban variantes R5-trópicas, y además en la mitad de los pacientes con variantes virales dual-mixtas, la población de variantes virales X4-trópicas llegó a ser indetectable (Skrabal *et al.* 2003). Sin embargo, hay que destacar que la supresión de las variantes virales X4, fue sólo transitoria y todos los pacientes mostraron una reversión a una población dual-mixta. Por otro lado, otro estudio llevado a cabo en 20 niños VIH+ que habían tomado terapia antirretroviral e iban a comenzar un régimen terapéutico basado en lopinavir/ritonavir, mostró respuesta virológica junto con un cambio en el uso del correceptor. Las variantes X4-trópicas fueron suprimidas de modo preferente, sugiriendo que el cambio en el uso del correceptor podría contribuir a la eficacia clínica de algunos fármacos anti-VIH (Galán *et al.* 2004).

Sin embargo, existen resultados controvertidos respecto al impacto que TARGA pudiera tener en la emergencia de variantes X4-trópicas y por tanto en el cambio en el uso del correceptor de CCR5 a CXCR4. Diversos estudios sugieren que HAART podría facilitar las condiciones necesarias que permiten la

emergencia gradual de variantes virales X4-trópicas a lo largo de la infección. En un estudio transversal llevado a cabo en 28 pacientes infectados con VIH-1 subtipo C, la emergencia de variantes X4-trópicas se asoció con el uso del tratamiento antirretroviral (Johnston *et al.* 2003). Por otro lado, un estudio longitudinal llevado a cabo en 32 pacientes, los cuales presentaban viremia plasmática suprimida durante más de 5 años con HAART, el cambio en el uso de CCR5 a CXCR4 se observó en 11 de 23 pacientes, mientras que las variantes X4-trópicas permanecieron predominantes en 9 de los pacientes con virus X4 en el momento basal (Delobel *et al.* 2005). Los pacientes con variantes X4-trópicas mostraron una menor ganancia de linfocitos T CD4+ a pesar de la completa supresión de la carga viral plasmática (Delobel *et al.* 2005).

La incidencia de cambio en el tropismo viral observada en esta tesis, tanto en pacientes naïve como pacientes que iniciaron tratamiento, fue relativamente baja y similar a lo largo del tiempo en ambos grupos (22,6% vs 28,6%, respectivamente), así como el número de oscilaciones en el cambio de tropismo observadas. Diversos estudios confirman estos resultados. En un estudio longitudinal realizado en 38 pacientes VIH que recibían TARGA y fracasaban al tratamiento, se observó que solamente un 13% de los pacientes, experimentó cambio en el uso del correceptor durante los 20 meses de media de seguimiento. Al igual que en nuestro estudio, se observó un cambio en el uso del correceptor en ambas direcciones, R5-X4-R5 y X4-R5-X4, en particular en dos pacientes (Lehmann *et al.* 2006). De modo similar, en otro estudio, tras

evaluar el cambio en el uso del correceptor en 73 pacientes pretratados que se encontraban en fracaso virológico, se observó que un 12% de los pacientes que presentaban un tropismo R5 en el momento basal, sufrieron un cambio a tropismo DM en un año, mientras que en uno de los pacientes, se observó un tropismo oscilante, R5-X4-R5, tras el mismo periodo de tiempo. Un 11% de los pacientes que inicialmente tenían tropismo DM en el momento basal, sufrieron un cambio en el uso del correceptor a CCR5 tras el mismo periodo (Hunt *et al.* 2007). Hay que destacar que el estudio realizado para esta tesis es el primero que compara pacientes pretratados en fracaso virológico con sujetos naïve. Por otro lado, el periodo de seguimiento fue de 6 años, mayor que en el resto de estudios longitudinales analizados.

Numerosos estudios han asociado, tanto en individuos naïve como en pacientes pretratados, la emergencia de variantes X4-trópicas con una rápida caída de los linfocitos T CD4+, y con una progresión más rápida a SIDA (Schuitemaker *et al.* 1992, Brumme *et al.* 2005, Daar *et al.* 2007, Moyle *et al.* 2005, Koot *et al.* 1993). La selección de variantes X4 en pacientes que iniciaron tratamiento y que presentaron repetidos fracasos virológicos, se asoció con un bajo número de linfocitos T CD4 en el momento basal así como con un bajo nadir de CD4, en pacientes pretratados, lo que concuerda con el concepto de que la selección de variantes X4 emerge como consecuencia del deterioro inmune profundo (Koot *et al.* 1993, Schuitemaker *et al.* 1992). Sin embargo, aunque el cambio de tropismo de R5 a X4 no se asoció con elevadas cargas

virales en el momento basal, sí se observó una correlación entre la presencia de variantes X4 con valores de cargas virales elevadas cuando se evaluó de manera transversal la asociación de variantes X4 con la carga viral, en pacientes que fracasaban a TARGA. Estos resultados concuerdan con un estudio llevado a cabo en pacientes pretratados en los cuales CXCR4 fue el correceptor más usado por aislados primarios derivados de pacientes virémicos con un número de linfocitos T CD4+ constante o con tendencia a aumentar bajo la presencia de TARGA (Holtkamp *et al.* 2000).

Cuando se compararon pacientes naïve que experimentaron cambio de tropismo y pacientes que no lo experimentaron, nuestros resultados no mostraron diferencias en el número de linfocitos T CD4+, así como en el nadir de CD4. La falta de asociación observada entre la presencia de variantes X4 y un bajo número de CD4 en el momento basal y a lo largo del estudio en pacientes naïve, probablemente se deba a que los pacientes naïve seleccionados en nuestro estudio, mantuvieron un sistema inmunológico relativamente poco deteriorado a lo largo del seguimiento. En este sentido, un estudio reciente en el que se evaluaron 402 individuos naïve durante 12 meses, mostró que los pacientes con cepas X4 o DM en el momento basal, presentaban un nivel de CD4 más bajo que los pacientes que tenían cepas virales R5-trópicas (Waters *et al.* 2008). Estos datos apoyan la hipótesis de que las variantes X4, emergen como consecuencia del daño inmune progresivo, en vez de ser responsables de una mayor caída de CD4. Por otro lado, los

datos obtenidos en esta tesis en pacientes naïve, cuando se realizó un análisis transversal en el tiempo, también apoyan esta hipótesis, ya que muestra una tendencia hacia una disminución de linfocitos T CD4⁺ en pacientes portadores de variantes X4-trópicas, comparada con aquellos pacientes con virus R5-trópicos (334 vs 522 células/ μ L, respectivamente). En un estudio llevado a cabo en 979 individuos naïve a tratamiento, se observó que pacientes que tenían variantes virales R5/X4 trópicas, presentaban un número de linfocitos T CD4 significativamente menor que individuos portadores de variantes R5-trópicas ($p < 0,0001$) (Brumme *et al.* 2005), lo que concuerda con nuestros datos.

Una de las limitaciones de nuestro estudio fue, que el tropismo viral se estimó usando una herramienta bioinformática, el predictor *PSSM*. Aunque se ha demostrado que existe una elevada concordancia entre ensayos fenotípicos y genotípicos (Poveda *et al.* 2007, Skrabal *et al.* 2007), en particular con *PSSM* (Labernardiere *et al.* 2004), hasta la fecha los métodos fenotípicos deberían ser considerados como la técnica de referencia. Sin embargo, nuestros resultados son similares a los obtenidos por Lehmann *et al.* que utilizó el predictor *geno2pheno* y Hunt *et al.*, que utilizó el ensayo fenotípico *Trofile* para la determinación del tropismo viral, por lo que aunque el uso de herramientas bioinformáticas podría considerarse una limitación, hay que destacar la similitud en la incidencia de cambio de tropismo observada a lo largo del tiempo en los distintos estudios (Lehmann *et al.* 2006, Hunt *et al.* 2007).

La expresión de los correceptores en la superficie de los linfocitos T, podría influir en el tropismo viral y por tanto en la patogénesis viral y en la progresión de la enfermedad (Connor *et al.* 1997, Paxton *et al.* 1998). La aprobación de maraviroc, el nuevo antagonista de CCR5, para uso clínico, hace necesario estudiar el impacto que TARGA podría tener sobre el nivel de expresión de la molécula CCR5 en linfocitos T. Diferencias en la expresión del correceptor, podrían influir en la actividad antiviral de estos compuestos debido a su mecanismo de acción (Lin *et al.* 2007).

Estudios previos han mostrado que el nivel de expresión del correceptor CCR5 en linfocitos T CD4+ y T CD8+, está regulado al alza en pacientes con infección crónica por VIH, comparado con individuos seronegativos (Ostrowski *et al.* 1998, Giovannetti *et al.* 1999, Nicholson *et al.* 2001). En otras enfermedades tales como hepatitis C (Ostrowski *et al.* 1998), mononucleosis infecciosa, tuberculosis (Wolday *et al.* 2005) y esclerosis múltiple, también se ha observado una regulación al alza de la molécula de CCR5 en linfocitos T CD4+, sugiriendo que esas alteraciones pueden representar una característica común de enfermedades inflamatorias ya sean de origen infeccioso o autoinmune. La particularidad de la infección VIH en relación con CCR5, reside en que esta molécula es precisamente uno de los receptores utilizados por el virus para entrar en la célula diana y por tanto la regulación al alza de su expresión podría ser empleada por el virus en su beneficio, haciendo más susceptible a las células diana.

La expresión del correceptor CCR5 normalmente se analiza como el porcentaje de células T CD4+ o CD8+ que muestra la molécula CCR5 en su superficie. Sin embargo, en la infección VIH *in vivo*, este parámetro parece ser menos determinante que la densidad de CCR5 (número de moléculas de CCR5/célula en la población celular CCR5+), debido a que se ha observado que la frecuencia varía a lo largo del tiempo en las células T CD4+ (de Roda Husman *et al.* 1999) de un individuo.

Nuestros resultados muestran una regulación al alza en el nivel de expresión de CCR5 en la subpoblación memoria de linfocitos T CD8+ en pacientes VIH-1 positivos comparada con individuos sanos, siendo similar a controles sanos en el resto de subpoblaciones de células T CD8+ y CD4+. A diferencia del nivel de expresión de CCR5, la densidad de expresión mostró una regulación al alza en linfocitos T CD4+ totales y en las subpoblaciones, naïve y memoria de pacientes VIH positivos, comparada con individuos sanos, lo que concuerda con las observaciones de otros investigadores (Smith *et al.* 2002).

La elevada activación inmune observada en pacientes VIH positivos en comparación con individuos sanos tanto en células T CD4+ como en T CD8+ concuerda con estudios previos (Smith *et al.* 2002, Giovanetti *et al.* 1999). La expresión de CD38 en células T CD8+ se relacionó directamente con la carga viral, mientras que la expresión de CD38 en linfocitos T CD4+ se correlacionó

inversamente con el conteo de CD4, como se ha observado previamente (Nicholson *et al.* 2001). Aunque algunos estudios han mostrado una asociación entre el nivel de activación en linfocitos T CD4+ y T CD8+ y el nivel de expresión de CCR5 en ausencia de TARGA (Ostrowski *et al.* 1998, Smith *et al.* 2002, Nicholson *et al.* 2001), sin embargo nuestro estudio no confirma esa observación. Las diferentes metodologías usadas para detectar y medir la activación inmune (Ostrowski *et al.* 1998, Smith *et al.* 2002), podrían explicar las diferencias observadas entre esos estudios y nuestros resultados.

Existe controversia respecto a la evolución del nivel de expresión de CCR5 en linfocitos T, tras administrar TARGA. Algunos autores han observado una disminución en el nivel y/o densidad de expresión de CCR5 en células T CD4+ y T CD8+ en pacientes que no fracasaban a TARGA, en periodos de seguimiento de 12 a 28 semanas (Smith *et al.* 2002, Giovannetti *et al.* 1999, Zhang *et al.* 2006). Sin embargo, hay que destacar que algunos de los pacientes en los que se observó esa disminución en el nivel de expresión de CCR5, mostraron un rebrote tras 6 meses de tratamiento (Giovannetti *et al.* 1999). Por otro lado, otros autores no han observado una disminución en la densidad de CCR5 en pacientes VIH tras el inicio de TARGA, (Reyness *et al.* 2001), estableciendo que la densidad de expresión de CCR5 en linfocitos T CD4+ es constante a lo largo del tiempo en cada individuo, incluso en pacientes en tratamiento que presentan un aumento de linfocitos T CD4+. Los resultados obtenidos en esta tesis, muestran que tras 2 años de éxito

terapéutico, la densidad de CCR5 en células T CD4+ no varió, sino que continuó significativamente aumentada en pacientes VIH positivos comparada con individuos sanos. Por tanto, una distinta evolución en la expresión de CCR5 dependiente del tiempo de seguimiento tras el inicio de la terapia antirretroviral, podría explicar estas diferencias.

En contraste con la evolución de CCR5, la expresión del marcador de activación CD38, tendió a disminuir en pacientes en tratamiento antirretroviral con viremia suprimida, lo que concuerda con estudios previos realizados tanto en linfocitos T CD8+ (Kaufmann *et al.* 1999, Bouscarat *et al.* 1998) como en T CD4+ (Benito *et al.* 2005, Zhang *et al.* 2006). Por tanto, observamos una distinta evolución en la activación inmunológica y en la expresión de CCR5, en pacientes en tratamiento con viremia suprimida, lo cual es concordante con la falta de asociación observada entre ambos parámetros en el momento basal.

Nuestros resultados sugieren que la supresión de la replicación viral debido al efecto de TARGA durante al menos dos años, no influye significativamente en la expresión de CCR5 en linfocitos T CD4+ y CD8+. Por tanto, la actividad de los antagonistas de CCR5 no debería diferir en un individuo VIH positivo antes y después del control de la replicación viral con TARGA.

CONCLUSIONES

1. Las herramientas genotípicas para la determinación del uso de los correceptores CCR5 o CXCR4 por el VIH, presentan una buena concordancia con los resultados fenotípicos en muestras de pacientes VIH+, infectados por subtipos B. La herramienta bioinformática $PSSM_{X4-R5}$ presentó los mejores resultados de concordancia (86%), con una buena sensibilidad para la detección de variantes X4-trópicas.
2. La prevalencia de variantes X4-trópicas en pacientes VIH+, parece estar directamente relacionada con el estadio de la infección, siendo de hasta un 35% en los pacientes que reciben tratamiento antirretroviral, del 15% en los pacientes naïve con infección crónica, y de sólo un 9% en seroconvertidores recientes.
3. La tasa de cambio del tropismo viral de CCR5 a CXCR4 y viceversa, es relativamente baja en pacientes en tratamiento antirretroviral. También lo es en pacientes naïve seguidos durante varios años.
4. La emergencia de variantes X4-trópicas parece ser independiente de la exposición a TARGA. Los principales determinantes de la selección de variantes X4-trópicas parecen ser un bajo nivel de linfocitos T CD4+ antes de iniciar TARGA y un bajo nadir de linfocitos T CD4+. En pacientes bajo tratamiento antirretroviral con fracaso virológico, la emergencia de variantes X4-trópicas podría ser la consecuencia más

que la causa del progresivo deterioro inmunológico provocado por el VIH.

5. La supresión de la replicación viral por el TARGA no influye significativamente en la expresión de CCR5 en linfocitos T CD4+ y T CD8+. Por tanto, la actividad de los antagonistas de CCR5, no debería diferir en individuos VIH+ antes y después del control de la replicación viral con otros antirretrovirales.

BIBLIOGRAFÍA

Alkhatib G, Combadiere C, Broder C, *et al.* **CC CKR5: a Rantes, MIP-1 α , MIP-1 β receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1.** *Science* 1996, **272**:1995-1958.

Andeweng A, Leeflang P, Osterhaus A, *et al.* **Both the V2 and V3 regions of the HIV-1 surface glycoprotein functionally interact with other envelope regions in syncytium formation.** *J Virol* 1993, **67**:3232-3239.

Anonymous. **FDA approves maraviroc tablets.** *AIDS patient care and STDs* 2007, **21**:702.

Asjö B, Morfeldt-Månson L, Albert J, *et al.* **Replicative capacity of human immunodeficiency virus from patients with varying severity of HIV infection.** *Lancet* 1986, **2**:660-662

Barre-Sinoussi F, Chermann J, Rey F, *et al.* **Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS).** *Science* 1983, **220**:868-871.

Benito J, López M, Lozano S, *et al.* **Differential upregulation of CD38 on different T-cell subsets may influence the ability to reconstitute CD4⁺ T cells under successful highly active antiretroviral therapy.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005, **38**:373-381.

Berger E. **HIV entry and tropism: the chemokine receptor connection.** *AIDS* 1997, **11**(Suppl A):S3-S16.

Berger E, Doms R, Fenyo E, *et al.* **A new classification of HIV-1.** *Nature* 1998, **391**:240.

Biti R, French R, Young J, *et al.* **HIV-1 infection in an individual homozygous for the CCR5 deletion allele.** *Nat Med* 1997, **3**:252-253.

Björndal A, Deng H, Jasson M, *et al.* **Co-receptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype.** *J Virol* 1997, **71**:7478-7487.

Bleul C, Farzan M, Choe H, *et al.* **The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry.** *Nature* **382**:829-832.

Bomsel M and David V. **Mucosal gatekeepers: selecting HIV viruses for early infection.** *Nat Med* 2002, **8**:114-116.

Bouscarat F, Levacher M, Landman R, *et al.* **Changes in blood CD8+ T lymphocyte activation status and plasma HIV-RNA levels during antiretroviral therapy.** *AIDS* 1998, **12**:1267-1273.

Bozzette S, McCutchan J, Spector S, *et al.* **A cross-sectional comparison of persons with syncytium- and non-syncytium-inducing human immunodeficiency virus.** *J Infect Dis* 1993, **168**:1374-1379.

Boyd M, Simpson G, Cann A, *et al.* **A single amino acid substitution in the V1 loop of HIV-1 gp120 alters cellular tropism.** *J Virol* 1993, **67**:3649-3652.

Brumme Z, Goodrich J, Mayer H, *et al.* **Molecular and clinical epidemiology of CXCR4-using HIV-1 in a large population of antiretroviral-naïve individuals.** *J Infect Dis* 2005, **192**:466-474.

Chesebro B, Wehrly K, Nishio J, *et al.* **Mapping of independent V3 envelope determinants of human immunodeficiency virus type 1 macrophage**

tropism and syncytium formation in lymphocytes. *J Virol* 1996, **70**:9055-9059.

Connor R, Mohri H, Cao Y, *et al.* **Increased viral burden and cytopathicity correlate temporally with CD4+ T-lymphocyte decline and clinical progression in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals.** *J Virol* 1993, **67**:1772-1777.

Connor R, Sheridan K, Ceradini D, *et al.* **Change in correceptor use correlates with disease progression in HIV-1 infected individuals.** *J Exp Med* 1997, **185**:621-628.

Brenchley J, Schacker R, Ruff L, *et al.* **CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract.** *J Exp Med* 2004, **200**:749-759.

Brumme Z, Goodrich J, Mayer H, *et al.* **Molecular and clinical epidemiology of CXCR4-using HIV-1 in a large population of antiretroviral-naive individuals.** *J Infect Dis* 2005, **192**: 466-474.

Cammack N. **The potencial for HIV fusion inhibition.** *Curr Opin Infect Dis* 2001, **14**:13-16.

Castonguay L, Weng Y, Adolfsen W, *et al.* **Binding of 2-aryl-4(piperidin-1yl) butanmines and 1,3,4-trisubstitued pyrrolidines to human CCR5: a molecular modelling-guide mutagenesis study of the binding pocket.** *Biochemistry* 2003, **42**:1544-1550.

Chazen G, Pereira G, Le Gros G, *et al.* **IL-7 is a T cell growth factor.** *Proc Natl Acad Sci* 1989, **86**:5923-7.

Cheng-Mayer C, Seto D, Tateno M, *et al.* **Biologic features of HIV-1 that correlate with virulence in the host.** *Science* 1988, **240**:80-82.

Coakley E, Petropoulos C and Whitcomb J. **Assessing chemokine co-receptor usage in HIV.** *Curr Opin Infect Dis* 2005, **18**:9-15.

Cocchi F, DeVico A, Garzino-Demo A, *et al.* **Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells.** *Science* 1995, **270**:1811-1815.

Collman R, Hassan N, Walter R, *et al.* **Infection of monocyte-derived macrophages with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1).** *J Exp Med* 1989, **170**:1149-1163.

Comier E and Dragic T. **The crown and stem of the V3 loop play distinct roles in HIV type 1 envelope glycoprotein interactions with the CCR5 coreceptor.** *J Virol* 2002, **76**: 8953-8957.

Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, *et al.* **Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1-infected individuals.** *J Exp Med* 1997, **185**:621-628.

Daar E, Kesler K, Petropoulos C, *et al.* **Baseline HIV-1 coreceptor tropism predicts disease progression.** *Clin Infect Dis* 2007, **45**:643-649.

Dalglish A, Beverley P, Clapham P, *et al.* **The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus.** *Nature* 1984, **312**:763-767.

Darcissac E, Vidal V, De La Tribonniere X, *et al.* **Variations in serum IL-7 and 90K/Mac-2 binding protein (Mac-2 BP) levels analyzed in cohorts of HIV-1 patients and correlated with clinical changes following antiretroviral therapy.** *Clin Exp Immunol* 2001, **126**:287-294.

D'Aquila R, Sutton L, Savara A, *et al.* **CCR5/ Δ CCR5 heterozygosity: a selective pressure for the syncytium-inducing human immunodeficiency virus type 1 phenotype.** *J Infec Dis* 1998, **177**:1549-53.

De Mendoza M, Rodríguez C, García F, *et al.* **Prevalence of X4 tropic viruses in patients recently infected with HIV-1 and lack of association with transmission of drug resistance.** *J Antimicrob Chemother* 2007, **59**:698-704.

De Mendoza C, Van Baelen K, Poveda E, *et al.* **Performance of a population-based HIV-1 tropism phenotypic assay and correlation with V3 genotypic prediction tools in recent HIV-1 seroconverters.** *AIDS* 2008, (en prensa).

De Jong J, De Ronde A, Keulen W, *et al.* **Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution.** *J Virol* 1992, **66**: 6777-80.

de Roda Husman A, Blaak H, Brouwer M, *et al.* **CC chemokine receptor cell-surface expression in relation to CC chemokine receptor 5 genotype and the clinical course of HIV-1 infection.** *J Immunol* 1999, **163**:4597-603.

de Roda Husman A, Koot M, Cornelissen M, *et al.* **Association between CCR5 genotype and the clinical course of HIV-1 infection.** *Ann Intern Med* 1997, **127**:882-890.

Dean M, Carrington M, Winkler C, *et al.* **Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene.**

Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* 1996, **273**:1856.

Deng H, Liu R, Ellmeier W, *et al.* **Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1.** *Nature* 1996, **381**:647-648.

Delobel P, Sandres-Sauné K, Cazabat M, *et al.* **R5 to X4 switch of the predominant HIV-1 population in cellular reservoirs during effective highly active antiretroviral therapy.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005, **38**:382-392.

Demarest J, Bonny T, Vavro C, *et al.* **HIV-1 co-receptor tropism in treatment naive and experienced subjects.** 44th *Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* Octobre 2004 [Abstract H-1136].

Doms R and Peiper S. **Unwelcomed guest with master keys: how HIV uses chemokine receptors for cellular entry.** *Virology* 1997, **235**:179-190.

Emerman M and Malim M. **HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unravelling viral and host cell biology.** *Science* 1998, **280**:1880-1884.

Dorr P, Westby M, Dobbs S, *et al.* **Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-HIV type 1 activity.** *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**:4721-4732.

Douek D, Picker L and Koup R. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol* 2003, **21**:265-304.

Evans L, McHugh T, Suites D, *et al.* **Differential ability of human immunodeficiency virus isolates to productively infect human cells.** *J Immunol* 1987, **138**:3415-3418.

Fear W, Kesson A, Naif H, *et al.* **Differential tropism and chemokine receptor expression of human immunodeficiency virus type 1 in neonatal monocytes, monocyte-derived macrophages, and placental macrophages.** *J Virol* 1998, **72**:1334-1344.

Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, *et al.* **HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane G protein-coupled receptor.** *Science* 1996, **272**:872-877.

Fenyö E, Morfeldt-Mäson L, Chiodi F, *et al.* **Distinct replicative and cytopathic characteristics of human immunodeficiency virus isolates.** *J Virol* 1988, **62**:4414-4419.

Fry T, Connick E, Falloon J, *et al.* **A potential role for interleukin 7 in T-cell homeostasis.** *Blood* 2001, **97**:2983-90.

Galán I, Jimenez J, González-Rivera M, *et al.* **Virological phenotype switches under salvage therapy with lopinavir-ritonavir in heavily pretreated HIV-1 vertically infected children.** *AIDS* 2004, **18**:247-255.

Gallo R, Sliski A and Wong-Staal F. **Origin of human T-cell leukaemia-lymphoma virus.** *Lancet* 1983, **2**:962-963.

Garrido C, Roulet V, Chueca N, *et al.* **Evaluation of eight different bioinformatics tools to predict viral tropism in different human immunodeficiency virus type 1 subtypes.** *J Clin Microb* 2008, **46**:887-891.

Giovannetti A, Ensoli F, Mazzetta F, *et al.* **CCR5 and CXCR4 chemokine receptor expression and β -chemokine production during early T cell repopulation induced by highly active antiretroviral therapy.** *Clin Exp Immunol* 1999, **118**:87-94.

Grabstein K, Namen A, Shanebeck K, *et al.* **Regulation of T cell proliferation by IL-7.** *J Immunol* 1990, **144**:3015-20.

Groenink M, Fouchier R, Broersen S, *et al.* **Relation of phenotype evolution of HIV-1 to envelope V2 configuration.** *Science* 1993, **260**:1513-1516.

Hallenberg S, Bosh V, Angliker H, *et al.* **Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160.** *Nature* 1992, **360**:358-361.

Hardy D, Reynes J, Konourina I, *et al.* **Efficacy and safety of maraviroc plus optimized background therapy in treatment-experienced patients infected with CCR5-tropic HIV-1: 48-week combined analysis of the MOTIVATE studies.** *15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*, Febrero 2008 [Abstract 792].

Harouse J, Gettie A, Tan R, *et al.* **Distinct pathogenic sequela in rhesus macaques infected with CCR5 or CXCR4 utilizing SHIVs.** *Science* 1999, **284**:816-819.

Hickman C, Crim J, Mostowski H, *et al.* **Regulation of human cytotoxic T lymphocyte development by IL-7.** *J Immunol* 1990, **145**:2415-20.

Hofmeister R, Khaled A, Benbernou N, *et al.* **Interleukin-7 physiological roles and mechanisms of action.** *Cytok Growth Factor Rev* 1999, **10**:41-60.

Hoffman N, Seillier-Moiseiwitsh F, Ahn J, *et al.* **Variability in the HIV-1 gp120 env protein linked to phenotype-associated changes in the V3 loop.** *J Virol* 2002, **76**:3852-3864.

Holtkamp N, Otteken A, Findhammer S, *et al.* **Unexpected coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates from viremic patients under highly active antiretroviral therapy.** *J Infect Dis* 2000, **181**:513-521.

Hosoya N, Su Z, Wilkin T, *et al.* **Assessing HIV-1 tropism in ACTG 5211: a comparison of assays using replication-competent virus from peripheral blood mononuclear cells versus plasma-derived pseudotyped virions.** 2nd *Workshop Targeting HIV Entry*, Octubre 2006 [Abstract 33].

Hoxie J. **Hypothetical assignment of intrachain disulfide bonds for HIV-2 and SIV envelope glycoproteins.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 1991, **7**:495-499.

Hwang S, Boyle T, Lyerly H, *et al.* **Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1.** *Science* 1991, **253**:71-74.

Huang Y, Paxton W, Wolinsky S, *et al.* **The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression.** *Nat Med* 1996, **2**:1240-1243.

Huang W, Wrin T, Uap J, *et al.* **A rapid multifunctional HIV-1 entry assay for measuring drug susceptibility, coreceptor tropism, and antibody neutralization.** 41st *Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Septiembre 2001 [Abstract 1968].

Hunt P, Harrigan P, Huang W, *et al.* **Prevalence of CXCR4 tropism among antiretroviral-treated HIV-1-infected patients with detectable viremia.** *J Infect Dis* 2006, **194**:926-930.

Hunt P, Huang W, Coakley E, *et al.* **Longitudinal evaluation of viral co-receptor tropism switches among HIV-infected patients with drug-resistant viremia.** 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Febrero 2007 [Abstract 619].

Hussain LA and Lehner T. **Comparative investigation of Langerhans' cells and potential receptors for HIV in oral, genitourinary and rectal epithelia.** *Immunology* 1995, **85**:475-484.

Jensen M, Li F, van't Wont A, *et al.* **Improved co-receptor usage prediction and genotypic monitoring of R5 to X4 transition by motif analysis of HIV type 1 env V3 loop sequences.** *J Virol* 2003, **77**:13376-13388.

Johnston E, Zijenah L, Mutetwa S, *et al.* **High frequency of syncytium-inducing and CXCR4-tropic viruses among HIV type 1 subtype C-infected patients receiving antiretroviral treatment.** *J Virol* 2003, **77**:7682-7688.

Jordan C, Watkins B, Kufta C, *et al.* **Infection of brain microglial cells by human immunodeficiency virus type 1 is CD4 dependent.** *J Virol* 1991, **65**: 736-42.

Jourdan P, Vendrell J, Huguet M, *et al.* **Cytokines and cell surface molecules independently induce CXCR4 expression on CD4+ CCR7+ human memory T cells.** *J Immunol* 2000, **165**:716-24.

Kaufmann G, Zaunders J, Cunningham P, *et al.* **Phenotypic analysis of CD8+ T lymphocytes in a cohort of HIV type 1-infected patients treated with**

saquinavir, ritonavir, and two nucleoside analogs for 1 year, and association with plasma HIV type 1 RNA. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999, 15:963-972.

Kawamura T, Kurtz S, Blauvelt A, *et al.* **The role of Langerhans cells in the sexual transmission of HIV. *J Dermatol Sci* 2005, 40:147-155.**

Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, *et al.* **T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 1984, 312:767-768.**

Koot M, Keet I, Vos A, *et al.* **Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate for CD4+ cell depletion and progression to AIDS. *Ann Intern Med* 1993, 118:681-688.**

Koot M, Vos A, Keet R, *et al.* **HIV-1 biological phenotype in long term infected individuals, evaluated with an MT-2 cocultivation assay. *AIDS* 1992, 6:49-54.**

Kuhmann S and Moore J. **The HIV-1 phenotypic variants: deadly and deadlier. *J Viral Entry* 2005, 1:4-16.**

Labernardiere J, Lebel-Binay S, Faudon J, *et al.* **Tropism determination and performance of Phenoscript HIV-1 entry inhibitors assay. *Antivir Ther* 2004, 9:S141.**

Lalezari J, DeJesus E, Lampiris H, *et al.* **Efficacy and safety of maraviroc plus optimized background therapy in viremic ART-experienced patients infected with CCR5-tropic HIV-1: 24-week results of a Phase 2b/3 study in the US and Canada. 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Febrero 2007 [Abstract 104bB].**

Lehmann C, Däumer M, Boussaad I, *et al.* **Stable coreceptor usage in patients with ongoing treatment failure on HAART.** *J Clin Virol* 2006, **37**:300-304.

Leonard C, Spellman M, Riddle L, *et al.* **Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant HIV envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells.** *J Biol Chem* 1990, **265**:10373-10382.

Levy J. **Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection.** *Microbiol Rev* 1993, **57**:183-189.

Li Q, Duan L, Estes J, *et al.* **Peak SIV replication in resting memory CD4⁺ T cells depletes gut lamina propria CD4⁺ T cells.** *Nature* 2005, **434**:1148-1152

Lin Y, Mettling C, Portales P, *et al.* **The chemokine CCL5 regulates the in vivo cell surface expression of its receptor, CCR5.** *AIDS* 2007, **22**:430-2.

Lin Y, Portales P, Segondy M, *et al.* **CXCR4 overexpression during the course of HIV-1 infection correlates with the emergence of X4 strains.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005, **39**:530-536.

Liu S, Mittler J, Nickle D, *et al.* **Selection for human immunodeficiency virus type 1 recombinants in a patient with rapid progression to AIDS.** *J Virol* 2002, **76**:10674-10684.

Liu R, Paxton W, Choe S, *et al.* **Homozogous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection.** *Cell* 1996, **86**:367-377.

Llano A, Barretina J, Gutiérrez A, *et al.* **Interleukin-7 in plasma correlates with CD4 T cell depletion and may be associated with emergence of syncytium-inducing variants in HIV type 1-positive individuals.** *J Virol* 2001, **75**:10319-10325.

Louder M and Mascola J. **Determination of syncytium-inducing phenotype of primary HIV-1 isolates using MT-2 cells.** *HIV Protocols*. Editado por Nelson M, Kim JH. New Cork Human Press. 199. pp: 23-27.

Low A, Winnie D, Chan D, *et al.* **Current V3 genotyping algorithms are inadequate for predicting X4-coreceptor usage in clinical isolates.** *AIDS* 2007, **21**:F17-F24.

Lu M, Blacklow S and Kim P. **A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein.** *Nature Struct Biol* 1995, **2**:1075-1082.

Maddon PJ, Littman DR, Godfrey M, *et al.* **The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface protein T4: a new member of the immunoglobulin gene family.** *Cell* 1985, **42**: 93-104.

Margolis M and Shattock R. **Selective transmission of CCR5-utilizing HIV-1: the “gatekeeper” problem resolved?** *Nat Rev Microbiol* 2006, **4**:312-327.

Mastroianni C, Forcina G, d’Etorre G, *et al.* **Circulating levels of interleukin-7 in antiretroviral-naive and highly active antiretroviral therapy-treated HIV-infected patients.** *HIV Clin Trials* 2001, **2**:108-112.

Mattapallil J, Douek D, Hill B, *et al.* **Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection.** *Nature* 2005, **434**:1093-1097.

Mayer H, van der Ryst E, Saag M, *et al.* **Safety and efficacy of Maraviroc, a novel CCR5 antagonist, when used in combination with optimized background therapy for the treatment of antiretroviral-experienced subjects with dual/mixed-tropic HIV-1: 24-week results of a phase 2b exploratory trial.** 16th International AIDS Conference. Julio 2006 [Abstract THLB0215].

Mehandru S, Poles M, Tenner-Racz K, *et al.* **Primary Hiv-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract.** *J Exp Med* 2004, **200**:761-770.

Melby T, Despirito M, Demasi R, *et al.* **HIV-1 co-receptor tropism in triple-class-experienced patients: baseline correlates and relationship to Enfuvirtide response.** 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Febrero 2006 [Abstract 233].

Mellikan G, Markosyan R, Hemmati H, *et al.* **Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion.** *J Cell Biol* 2000, **151**:413-423.

Michael N, Nelson J, Kewalramani V, *et al.* **Exclusive and persistent use of the entry coreceptor CXCR4 by human immunodeficiency virus type 1 from a subject homozygous for CCR5 delta32.** *J Virol* 1998, **72**:6040-6047.

Miedema F, Tersmette M and van Lier R. **AIDS pathogenesis: a dynamic interaction between HIV and the immune system.** *Immunol Today* 1990, **11**:293-297.

Moore J, Kitchen S, Pugach P, *et al.* **The CCR5 and CXCR4 coreceptors – central to understanding the transmission and pathogenesis of human**

immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004, **20**:111-126.

Moore J, Trkola A and Dragic T. **Co-receptors for HIV-1 entry.** *Curr Opin Immunol* 1997, **9**:551-562.

Mosier D, Picchio G, Gulizia R, *et al.* **Highly potent RANTES analogues either prevent CCR5-using human immunodeficiency virus type 1 infection in vivo or rapidly select for CXCR4-using variants.** *J Virol* 1999, **73**:3544-3550.

Moyle G, Wildfire A, Mandalia S, *et al.* **Epidemiology and predictive factors for chemokine receptor use in HIV-1 infection.** *J Infect Dis* 2005, **191**:866-872.

Myszka D, Sweet R, Hensley P, *et al.* **Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**:9026-9031.

Napolitano L, Grant R, Deeks S, *et al.* **Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: Implications for T-cell homeostasis.** *Nat Med* 2001, **7**:73-79.

Nelson M, Konourina I, Lazzarin A, *et al.* **Efficacy and safety of maraviroc plus optimized background therapy in viremia, ART-experienced patients infected with CCR5-tropic HIV-1 in Europe, Australia and North America: 24-Week results.** *14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections.* Febrero 2007 [Abstract 104aLB].

Nicastrì E, Sarmati L, d'Etorre G, *et al.* **Replication capacity, biological phenotype, and drug resistance of HIV strains isolated from patients failing antiretroviral therapy.** *J Med Virol* 2003, **69**:1-6.

O'Brien TR, Winkler C, Dean M, *et al.* **HIV-1 infection in a man homozygous for CCR5-delta-32.** *Lancet* 1997, **349**:1219.

Nicholson J, Browning S, Hengel R, *et al.* **CCR5 and CXCR4 expression on memory and naïve T cells in HIV-14 infection and response to highly active antiretroviral therapy.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001, **27**:105-5.

Ostrowski M, Justement S, Catanzaro A, *et al.* **Expression of chemokine receptors CXCR4 and CCR5 in HIV-1-infected and uninfected individuals.** *J Immunol* 1998, **161**:3195-201.

Palella F, Delaney K, Moorman A, *et al.* **Declining morbidity and mortality among patients with advanced HIV infection.** *N Engl J Med* 1998, **338**:853-860.

Pastore C, Ramos A and Mosier D. **Intrinsic obstacles to human immunodeficiency virus type 1 coreceptor switching.** *J Virol* 2004, **78**:7565-7574.

Paxton W, Kang S and Koup R. **The HIV type 1 coreceptor CCR5 and its role in viral transmission and disease progression.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998, **14**(Suppl1):S89-S92.

Philpott S, Ledergerber B, Klimkait T, *et al.* **CXCR4-specific viral load predicts clinical HIV-1 disease progression during HAART.** *16th International AIDS Conference*. Agosto 2006 [Abstract ThAa0201].

Pillai S, Good B, Richman D, *et al.* **A new perspective on V3 phenotype prediction.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003, **19**:145-149.

Plum J, De Smedt M, Leclercq G, *et al.* **Interleukin 7 is a critical growth factor in early human T-cell development.** *Blood* 1996, **88**:4239-45.

Pope M and Haase A. **Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection.** *Nat Med* 2003, **9**:847-852.

Poveda E, Rodés B, Toro C, *et al.* **Evolution of the gp41 env region in HIV-infected patients receiving T-20, a fusion inhibitor.** *AIDS* 2002, **16**:1959-1961.

Princen K, Hatse S, Vermeire K, *et al.* **Establishment of a novel CCR5 and CXCR4 expressing CD4+ cell line which is highly sensitive to HIV and suitable for high-throughput evaluation of CCR5 and CXCR4 antagonists.** *Retrovirology* 2004, **1**:2-9.

Reeves J, Han D, Hunt P, *et al.* **Enhancements to the Trofile HIV co-receptor tropism assay enable improved detection of CXCR4-using subpopulations and earlier detection of CXCR4-using viruses in sequential patient samples.** *3^{er} Workshop Targeting HIV Entry*. Diciembre 2007 [Abstract 11].

Reinherz E, Kung P, Goldstein G, *et al.* **Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1979, **76**:4061-4065.

Resch W, Hoffman N and Swanstrom R. **Improved success of phenotype prediction of the human immunodeficiency virus type 1 from envelope variable loop 3 sequence using neural networks.** *Virology* 2001, **288**:51-62.

Reynes J, Portales P, Segondy M, *et al.* **CD4⁺ T cell surface CCR5 density as a determining factor of virus load in persons infected with HIV type 1.** *J Infect Dis* 2000, **181**:927-32.

Reynes J, Portales P, Segondy M, *et al.* **CD4 T cell surface CCR5 density as a host factor in HIV-1 disease progression.** *AIDS* 2001, **15**:1627-34.

Richman D and Bozzette S. **The impact of the syncytium-inducing phenotype of human immunodeficiency virus on disease progression.** *J Inf Dis* 1994, **169**:968-974.

Roos M, Lange J, de Goede R, *et al.* **Viral phenotype and immune response in primary human immunodeficiency virus type 1 infection.** *J Infect Dis* 1992, **165**:427-432.

Samson M, Libert F, Doranz B, *et al.* **Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene.** *Nature* 1996, **385**:722-725.

Schellenkes P, Roos M, De Wolf F, *et al.* **Low T-cell responsiveness to activation via CD3/TCR is a prognostic marker for acquired-immunodeficiency-syndrome (AIDS) in human immunodeficiency virus-1 (HIV-1-infected men.** *J Clin Immunol* 1990, **10**:121-127.

Saag M, Ive P, Heera J, *et al.* **A multicenter, randomized, double-blind, comparative trial of a novel CCR5 antagonist, maraviroc vs. efavirenz, both in combination with combivir (zidovudine/lamivudine), for the treatment of antiretroviral naïve patients infected with R5 HIV-1: week 48 results of the MERIT study.** *4th IAS Conference on HIV pathogenesis, treatment and prevention.* Julio 2007 [Abstract WESS104].

Sakaida H, Hori T, Yonezawa A, *et al.* **T-tropic HIV-1-derived V3 loop peptides directly bind to CXCR4 and inhibit T-tropic HIV-1 infection.** *J Virol* 1998, **72**:9763-9770.

Sattentau Q and Weiss R. **The CD4 antigen: physiological ligand and HIV receptor.** *Cell* 1988, **52**:631-633.

Schuitemaker H, Koot M, Kootstra N, *et al.* **Monocytotropic HIV-1 variants detectable in all stages of HIV-1 infection lack T-cell line tropism and syncytium-inducing ability in primary T-cell culture.** *J Virol* 1991, **65**:356-363.

Schuitemaker H, Koot M, Kootstra N, *et al.* **Biological phenotype of HIV type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytotropic to T-cell-tropic virus populations.** *J Virol* 1992, **66**:1354-1360.

Seelamgari A, Maddukuri A, Berro R, *et al.* **Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication.** *Front Biosci* 2004, **9**:2388-2413.

Shaheen F and Collman R. **Co-receptor antagonists as HIV-1 entry inhibitors.** *Curr Opin Infect Dis* 2004, **17**:7-16.

Sheppard H, Celum C, Michael N, *et al.* **HIV-1 infection in individuals with the CCR5-Delta32/Delta32 genotype.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002, **29**:307-313.

Sing T, Beerenwinkel N and Lengauer T. **Learning mixtures of localized rules by maximizing the area under the ROC curve.** *1st workshop on ROC (receiver operator characteristic) analysis. 16th European Conference on Artificial Intelligence.* Agosto 2004.

Sing T, Harrigan R, Beerenwinkel N, *et al.* **Immunologic markers improve genotypic prediction of HIV-1 coreceptor usage.** *1st Workshop Targeting HIV Entry*, Diciembre 2005 [Abstract 30].

Skrabal K, Troupin V, Labrosse B, *et al.* **Impact of antiretroviral treatment on the tropism of HIV-1 plasma virus populations.** *AIDS* 2003, **17**:809-814.

Skrabal K, Low A, Dong W, *et al.* **Determining human immunodeficiency virus coreceptor use in a clinical setting: degree of correlation between two phenotypic assays and a bioinformatics model.** *J Clin Microb* 2007, **45**:279-284.

Smith K, Kumar S, Pulvirenti J, *et al.* **CCR5 and CXCR4 expression after highly active antiretroviral therapy (HAART).** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002, **30**:458-60.

Spijkerman IJ, Koot M, Prins M, *et al.* **Lower prevalence and incidence of HIV-1 syncytium-inducing phenotype among infecting drug users compared with homosexual men.** *AIDS* 1995, **9**:1085-1092.

Tan J, Dudl E, Le Roy E, *et al.* **IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naïve T cells.** *Proc Natl Acad Sci* 2001, **98**:8732-7.

Tersmette M and Miedema F. **Interaction between HIV and the host immune system in the pathogenesis of AIDS.** *AIDS* 1990, **4**:S57-S66.

Tersmette M, de Goede R, Al B, *et al.* **Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex.** *J Virol* 1988, **62**:2026-2032.

Theodorou I, Meyer L, Magierowska, M, *et al.* **HIV-1 infection in an individual homozygous for CCR5 delta 32. Seroco Study Group.** *Lancet* 1997, **349**: 1219-1220.

van Rij R, Hazenberg M, van Benthem B, *et al.* **Early viral load and CD4+ T cell count, but not percentage of CCR5+ or CXCR4+ CD4+ T cells, are associated with R5-toX4 HIV type 1 virus evolution.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003, **19**:389-398.

van Rij R, Portegies P, Hallaba T, *et al.* **Reduced prevalence of the CCR5 delta32 heterozygous genotype in human immunodeficiency virus-infected individuals with AIDS dementia complex.** *J infect Dis* 1999, **182**:854-857.

van't Wout A, Kootstra N, Mulder-Kampinga G, *et al.* **Macrophage-tropic variants initiate human immunodeficiency virus type 1 infection after sexual, parenteral, and vertical transmissión.** *J Clin Invest* 1994, **94**: 2060-2067.

Varmus H. **Retroviruses.** *Science* 1998, **240**:1427-1435.

Veazey R, DeMaria M, Chalifoux L, *et al.* **Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection.** *Science* 1998, **280**:427-431.

Waters L, Mandalia S, Randell P, *et al.* **The impact of HIV tropism on decreases in CD4 cell count, clinical progression, and subsequent response to a first antiretroviral therapy regimen.** *Clin Infect Dis* 2008, **46**:1617-1623.

Weiss C. **HIV-1 gp41: Mediator of fusion and target for inhibition.** *AIDS Rev* 2003, **5**:214-221.

Westby M, Lewis M, Whitcomb J, *et al.* **Emergence of CXCR4-using HIV type 1 variants in a minority of HIV-1 infected patients following treatment with the CCR5 antagonist maraviroc is from a pre-treatment CXCR4-using virus reservoir.** *J Virol* 2006, **80**:4909-4920.

Wilkin T, Su Z, Kuritzkes D, *et al.* **Co-receptor tropism in patients screened for ACTG 5211, a Phase 2 study of Vicriviroc, a CCR5 inhibitor.** 13th *Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*. Febrero 2006 [Abstract 655].

Wolday D, Tegbaru B, Kassu A, *et al.* **Expression of chemokine receptors CCR5 and CXCR4 on CD4+ T cells and plasma chemokine levels during treatment of active tuberculosis in HIV-1-coinfected patients.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005, **39**:265-271.

Wu L, Paxton W, Kassam N, *et al.* **CCR5 levels and expresión patterns correlate with infectability by macrophage-tropic HIV-1 *in vitro*.** *J Exp Med* 1997, **185**:1681-1691.

Zaitseva M, Blauvelt A, Lee S, *et al.* **Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection.** *Nat Med* 1997, **3**:1369-1375.

Zhang Y, Dragic T, Cao Y, *et al.* **Use of coreceptors other than CCR5 by non-syncytium-inducing adult and pediatric isolates of human immunodeficiency virus type 1 is rare *in vitro*.** *J Virol* 1998, **72**:9337-9344.

Zhang Z, Shang H, Jiang Y, *et al.* **Activation and coreceptor expression of T lymphocytes induced by highly active antiretroviral therapy in Chinese HIV/AIDS patients.** *Chin Med J* 2006, **119** :1966-1971.

ANEXOS

**Anexo 1: Interpretación de los Genotipos de Resistencia a los
Fármacos Antirretrovirales.**

Interpretación de resistencia a ITIAN

FARMACO	AZT	D4T	DDI	ABC	TDF	3TC	FTC
Grupo 3 (3 puntos)	T215F/Y M41L	T215F/Y	L74I/V K65R	K65R L74I/V	K65R	M184V/I	M184V/I
Grupo 2 (2 puntos)	K70R L210W	M41L V75M/T/S	T69D/G K70E T215F/Y	K70E Y115F M184I/V T215F/Y	M41L K70E L210W	K65R	K65R
Grupo 1 (1 punto)	D67E/G/N K70G T215C/D/E/I/V/S K219E/N/Q/R/T/W	K65R D67E/G/N T69D/G/N K70R V75A/I L210W T215C/D/E/I/V/S K219E/N/Q/R/T/W	M41L K65N D67E/G/N T69N V75A/IM/T/S M184V L210W	M41L K65N K70R L210W	K65N D67E/G/N K70R T215F/Y	K65N K70E T215F/Y	K65N K70E T215F/Y
Hipersusceptibilidad (- 1 punto)	K65R M184V	M184V			M184V		
Multirresistencia:							
Del 67 / 69	R	R	R	R	I	R	R
69ins	R	R	R	R	R	I	I
Q151M/L (complejo)	R	R	R	R	I	I	I
≥ 5 TAMs	R	R	R	R	R	I	I
Interpretación			≥ 5 4 – 3 ≤ 2	= = =	Resistente (R) Resistencia Intermedia (I) Sensible (S)		

Rojo: Aquellas mutaciones que por sí solas comprometen la respuesta al fármaco.

Verde: Mutaciones que producen hipersusceptibilidad y que restan 1 punto al computo total.

Complejo Q151M: A62V, V75I, F77L, F116Y, Q151M

TAMs: M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F, K219Q/E

Interpretación de resistencia a ITINAN

Fármaco	NVP (nevirapina)	EFV (efavirenz)	ETV (etravirina)*
Grupo 3 (3 puntos)	L100I K103N/S/T V106A/M V179F Y181C/I/V/S Y188C/L G190A/C/E/G/S/V/T F227C M230L K238T/N Y318F	L100I K103N/S/T V106A/M Y181C/I/V Y188L G190A/C/E/Q/S/V/T P225H M230L	V179F
Grupo 2 (2 puntos)	K101E/P E138K Y188H	K103I/P E138K V179F Y181S Y188C/H F227C	E138K Y181C/I/V Y188L G190C/E/Q/S/V/T M230L
Grupo 1 (1 punto)	A98G L100V K101H/N K103Q/E V106L V108I V179D/E/M F227L/Y	A98G L100V K101E/H/N K103Q/E V106L V108I V179ED/E/M K238T/N Y318F	V90I A98G L100I/V K101E/P K103N/S/T V106A/M/I V179D/E/M Y181S Y188C/H G190A P225H F227C/L
Interpretación	≥ 3 puntos = Resistencia (R) ≤ 2 puntos = Sensible (S)		

* Existen pocos datos clínicos hasta la fecha. La interpretación de resistencias a ETV se basa en los datos obtenidos en los ensayos DUET.

Polimorfismos frecuentes en subtipos no-B en posiciones de resistencia: A98S; V179I

Interpretación de resistencia a IP

FARMACO	IDV	SQV	ATV*	FPV	LPV	TPV	DRV
<i>Potenciados con ritonavir</i>							
Grupo 3 (3 puntos)	V82A/F/S/T	G48A/M/S/T/V L90M I84A/V	I50L N88S	I50V I84A/V	I47A	V82L/T	I50V
Grupo 2 (2 puntos)	M46I/L L76V V82M I84A/C/V L90M	I54V I84C	M46I/L V82A/F/S/T I84A/C/V N88T/G L90M	M46I/L I47A/V I54L/M L76V I84C L90M	M46I/L I50V I54L/M/V V82A/F/S/T I84V	I47V I54A I84V	I47V I54M L76V I84A/C/V
Grupo 1 (1 punto)	V32I M46V G48M/V I54A/L/M/S/T/V V82C/L N88S	I54A/L/M/S/T G73C/S/T V82A/F/L/M/T N88D	V32I M46V G48V/M I54A/M/S/T/V V82L/M N88D	M46V I54A/T/V V82A/F/L/M/S/T	V32I M46V I47V G48M/V I54A/S/T L76V V82C/L/M I84C L90M	M46I/L/V I54V Q58E T74P V82A/C/M/F/S N83D	V32I M46I/L/V 47A I54L V82A/F/S/T/M/L/C
Hipersusceptibilidad (- 1 punto)	I50L	I50L		N88S	I50L	I50L/V I54L	I50L
Interpretación			≥ 5 puntos = Resistente (R) 4 – 3 puntos = Resistencia intermedia (I) ≤ 2 puntos = Sensible (S)				

* La resistencia a ATV sin potenciar con ritonavir se considera a partir de 4 puntos.

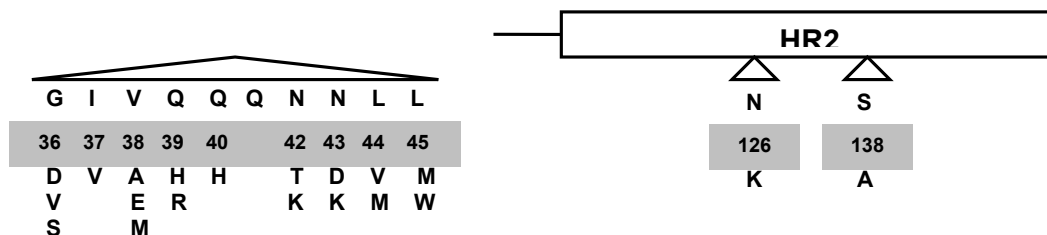
Rojo: Aquellas mutaciones que por sí solas comprometen la respuesta al fármaco.

Verde: Mutaciones que producen hipersusceptibilidad y que restan 1 punto al computo total.

Mutaciones compensatorias: L10I/F/R/V/Y; V11I; L24I; L33F; F53L/Y; A71I/T/V; G73A/C/S/T; L89I/M/T/V. Sólo en caso de resistencia intermedia con 4 puntos otorgan resistencia.

Polimorfismos frecuentes en subtipos no-B en posiciones de resistencia: L10V/I; K20I/R; M36I; V82I; L89M/I

Mutaciones en el gen *env* (región HR1 y HR2 de gp41) asociadas con resistencia a enfuvirtida



	Mutación	Interpretación
HR1	G36V/S/D/E	R
	I37V	R
	V38A/E/M	R
	Q40H	R
	N42K/T	R
	N43D/K	R
	L45W	R

Las mutaciones Q39R/H, L44M/V y L45M en HR1, así como las mutaciones N126K y S138A en HR2, suelen aparecer generalmente en combinación con las de la tabla. Por sí solas podrían disminuir parcialmente la sensibilidad al fármaco.

N42S es un polimorfismo y no confiere resistencia

S138A es un polimorfismo natural en variantes del grupo O y N del VIH-1.

Anexo 2: Publicaciones surgidas de esta Tesis Doctoral.

- **Briz V**, Poveda E and Soriano V. HIV entry inhibitors: mechanisms of action and resistance pathways. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006, 57:619-27.
- **Briz V**, Poveda E and Soriano V. Entrada del VIH en las células: mecanismos y posibilidades terapéuticas. *Medicina Clínica* 2006, 126:341-8.
- Poveda E, **Briz V**, Quiñones-Mateu M and Soriano V. HIV tropism: diagnostic tools and implications for disease progression and treatment with entry inhibitors. *AIDS* 2006, 20:1359-67.
- Poveda E, **Briz V**, Roulet V, Del Mar González M, Faudon JL, et al. Correlation between a phenotypic assay and three bioinformatics tools for determining HIV co-receptor use. *AIDS* 2007, 21:1487-90.
- Poveda E, **Briz V**, de Mendoza C, Benito JM, Corral A, Zahonero N, et al. Prevalence of X4 tropic HIV-1 variants in patients with differences in disease stage and exposure to antiretroviral therapy. *Journal of Medical Virology* 2007, 79:1040-6.
- **Briz V**, Poveda E, González MM, Martín-Carbonero, L, González-González R and Soriano V. Impact of antiretroviral therapy on viral tropism in HIV-

infected patients followed longitudinally for over 5 years. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2008, 61:405-10.

- **Briz V**, Poveda E, López M, González MM, Soriano V and Benito JM. Impact of antiretroviral therapy on CCR5 expression in HIV patients followed for over two years. AIDS (*in press*).

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIQ	Amplitud intercuartílica
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
β	Beta
AZT	Zidovudina
CA	Cápside
CCR5Δ32	deleción de 32 pares de bases en el gen <i>ccr5</i>
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
CN	Control negativo
cop/mL	Copias por mililitro
CP	Control positivo
ddl	Didanosina
DM	Dual/mixtas
DMSO	Dimetil sulfóxido
ECD	Ficoeritrina-Rojo de Texas X
EDTA	Ácido etilendiamin tetraacético
EFV	Efavirenz
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FP	Péptido de fusión
GALT	Tejido linfoide asociado al intestino
gp41	Glicoproteína 41
gp120	Glicoproteína 120
h	horas
HOS	Osteosarcoma humano
HR1	<i>Heptad-repeat 1</i> , región repetida
HR2	<i>Heptad-repeat 2</i> , región repetida
IF	Inhibidores de la fusión
IgG	Inmunoglobulina G
IgG2	Inmunoglobulina G 2
IL-7	Interleuquina 7

IN	Integrasa
IP	Inhibidores de la proteasa
IS	Inductoras de sincitios
ITIAN	Inhibidores de la transcriptasa inversa análogo de nucleósidos
ITINAN	Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogo de nucleósidos
Kb	Kilobase
KDa	Kilo Dalton
log	Logaritmo
LTR	<i>Long terminal repeat</i> , secuencias terminales largas
M-trópicas	Línea celular monocito-macrófago
MA	Matriz
mg	Miligramo
min	Minuto
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i> , proteína inflamatoria de macrófagos
mL	Mililitro
MM	Marcador de peso molecular
MVC	Maraviroc
NIS	No inductoras de sincitios
nm	nanometro
nt	Nucleótido
Nt	N-terminal
NU	Nucleocápside
μL	Microlitro
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , tampón fosfato salino pH 7,2
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa
PE	Ficoeritrina
PECy5	Ficoeritrina cianina 5
pg/mL	Picogramo por mililitro
PR	Proteasa

R5	Variantes CCR5-trópicas
R10	Medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de SBF
RE	Retículo endoplasmático
REE	Elemento de respuesta a la proteína Rev
RT	Retrotranscriptasa
SBF	Suero bovino fetal
SDF-1	<i>Stromal Cell Derived Factor-1</i>
seg	Segundo
SIDA	Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida
SU	Superficie
T-trópicas	Línea celular linfocitos T CD4+
TARGA	Terapia antirretroviral de gran actividad
TI	Transcriptasa inversa
TM	Transmembrana
UDVP	Usuario de drogas por vía parenteral
UI	Unidades internacionales
VCV	Vicriviroc
vs	<i>versus</i>
VIH-1	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1
VIH-2	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2
wt	<i>wild type</i> , fenotipo salvaje
X4	Variantes virales CXCR4-trópicas
°C	Grado centígrado